

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Untersuchungen zu Septin7 und anderen  
differentiell regulierten Lymphozytenproteinen  
bei der equinen rezidivierenden Uveitis

von  
Nina Berit Burkhardt  
aus  
Würzburg

München 2015

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Tierphysiologie

Arbeit angefertigt unter Leitung von  
Prof. Dr. Cornelia A. Deeg

**Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

**Berichterstatter:** Prof. Dr. Cornelia A. Deeg

**Korreferent/en:** Univ.-Prof. Dr. Lutz S. Göhring  
Priv.-Doz. Dr. Birgit Viertlböck

Tag der Promotion: 18.Juli 2015

*Meinem Vater*

<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2 LITERATUR .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Definition und Bedeutung der equinen rezidivierenden Uveitis .....</b>	<b>3</b>
2.1.1 Uveitis .....	3
2.1.2 Klinik und Therapie der ERU .....	3
2.1.3 Die ERU als Tiermodell .....	4
<b>2.2 Immunpathophysiologie der ERU .....</b>	<b>6</b>
2.2.1 Rezidiventstehung .....	6
2.2.2 Verschiedene Möglichkeiten der T-Zellantwort.....	8
<b>2.3 Infiltration immunprivilegierter Gewebe.....</b>	<b>10</b>
2.3.1 Die Blut-Hirn-Schranke .....	10
2.3.2 Die Blut-Retina-Schranke .....	12
2.3.3 Transmigration von Lymphozyten über Barrieren immunprivilegierter Organe .....	14
2.3.3.1 Die Leukozyten-Adhäsionskaskade.....	15
2.3.3.2 Initiation und Ablauf der Transmigration .....	16
2.3.4 Phänotyp infiltrierender Lymphozyten bei autoimmuner Uveitis .....	17
<b>2.4 Differentielle Proteomanalyse von Leukozyten im Rahmen der ERU .....</b>	<b>19</b>
2.4.1 Differentiell regulierte Proteine auf Granulozyten .....	19
2.4.2 Differentiell regulierte Proteine auf Lymphozyten .....	22
<b>2.5 Untersuchungen zum differentiellen Oberflächenproteom von Immunzellen bei der ERU .....</b>	<b>25</b>
2.5.1 Vorteile proteomischer Studien.....	25
2.5.2 Die Untersuchung des Oberflächenproteoms.....	26
2.5.3 Differentielle Regulation des Oberflächenproteoms bei der ERU .....	28
<b>3 MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>30</b>
<b>3.1 Probenmaterial .....</b>	<b>30</b>
3.1.1 Puffer und Lösungen zur Gewinnung und Aufbereitung von PBL und VL .....	32
3.1.2 Gewinnung der Blutproben .....	34
3.1.3 Gewinnung der PBL mittels Dichtegradientenzentrifugation.....	34
3.1.4 Gewinnung von Glaskörperspülproben .....	34
3.1.5 Gewinnung von VL aus den Glaskörperspülproben .....	35

3.1.6 Zählung und Differenzierung der gewonnenen Zellen.....	35
3.1.7 Aufbewahrung von lebenden PBL und VL.....	36
3.1.8 Aufbereitung und Aufbewahrung von PBL für Western Blot.....	36
3.1.9 Aufbereitung von PBL für die Immunpräzipitation .....	36
<b>3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration der PBL-Lysate .....</b>	<b>37</b>
3.2.1 Puffer und Lösungen zur Proteinbestimmung .....	37
3.2.2 Durchführung der Proteinbestimmung .....	37
<b>3.3 Herstellung monoklonaler Antikörper .....</b>	<b>38</b>
3.3.1 Puffer und Lösungen für die Herstellung monoklonaler Antikörper .....	38
3.3.2 Immunisierung von Ratten und Mäusen mit Peptiden von Septin7 .....	39
3.3.3 Zellfusionierung und Gewinnung der instabilen Antikörper-Klone .....	39
3.3.4 Stabilisierung der Antikörper-Klone durch Reklonierung .....	40
<b>3.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....</b>	<b>41</b>
3.4.1 Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE .....	41
3.4.2 Durchführung der 1D Gelelektrophorese .....	44
<b>3.5 Western Blot .....</b>	<b>45</b>
3.5.1 Puffer und Lösungen für den Western Blot.....	45
3.5.2 Durchführung des Western Blots .....	47
3.5.3 Überprüfung des Proteintransfers mittels Ponceau-Färbung.....	47
3.5.4 Immunoblot .....	47
3.5.5 Statistische Auswertung .....	49
<b>3.6 Durchflusszytometrie .....</b>	<b>50</b>
3.6.1 Puffer und Lösungen für die Durchflusszytometrie .....	50
3.6.2 Antikörper für die Durchflusszytometrie .....	50
3.6.3 Fluoreszenzfärbung von PBL für die Durchflusszytometrie .....	51
3.6.3.1 Einfachfärbungen equiner PBL mit den anti-Septin7-Antikörper-Klonen.....	51
3.6.3.2 Doppelfärbung von Septin7, Vimentin oder Laktotransferrin und Lymphozytensubpopulationsmarkern auf equinen Lymphozyten .....	52
3.6.4 Detektion gefärbter Zellen mit dem Durchflusszytometer .....	53
3.6.5 Auswertung der durchflusszytometrischen Daten .....	54
3.6.6 Statistische Auswertung der durchflusszytometrischen Daten .....	55
<b>3.7 Immunzytochemie .....</b>	<b>56</b>
3.7.1 Puffer und Lösungen für die Immunzytochemie .....	56

3.7.2 Antikörper für die Immunzytochemie .....	56
3.7.3 Immunzytologische Färbung.....	57
<b>3.8 Immunhistochemie.....</b>	<b>58</b>
3.8.1 Puffer und Lösungen für die Immunhistochemie .....	58
3.8.2 Paraffinschnittherstellung .....	59
3.8.3 Entparaffinieren der Paraffinschnitte .....	59
3.8.4 Immunhistochemische Färbung.....	60
<b>3.9 Immunpräzipitation .....</b>	<b>61</b>
3.9.1 Puffer und Lösungen für die Immunpräzipitation .....	61
3.9.2 Durchführung der Immunpräzipitation .....	61
3.9.2.1 Screening-IP der stabilen anti-Septin7-Antikörper-Klone .....	62
3.9.2.2 IP zur Identifikation von Septin7-Interaktoren.....	63
3.9.2.3 IP zur Bestätigung der Septin7-Interaktoren.....	63
<b>3.10. Plasmamembranproteinpräparation durch Oberflächenbiotinylierung .....</b>	<b>64</b>
3.10.1 Puffer und Lösungen für die Oberflächenbiotinylierung.....	64
3.10.2 Biotinylierung der Oberflächenproteine .....	67
3.10.3 Anreicherung der biotinylierten Zelloberflächenproteine .....	67
3.10.4 Proteinextraktion.....	68
3.10.5 Aufreinigung und Konzentration der deglycosylierten Peptidfraktion mittels PepClean Säulen.....	69
<b>3.11 Massenspektrometrische Identifikation und Quantifizierung von Proteinen .....</b>	<b>70</b>
3.11.1 FASP-Verdau der Immunpräzipitate.....	70
3.11.1.1 Puffer und Lösungen für den FASP-Verdau .....	70
3.11.1.2 Durchführung des FASP-Verdaus .....	71
3.11.2 LC-MS/MS .....	72
3.11.2.1 Puffer und Lösungen für die massenspektrometrische Analyse.....	72
3.11.2.2 Durchführung der massenspektrometrischen Untersuchung .....	72
3.11.3 Quantitative Auswertung mit Progenesis.....	73
3.11.4 Datenbanksuche für die mittels LC-MS/MS identifizierten Peptide .....	74
3.11.5 Suche und funktionelle Analyse von Orthologen und Paralogen.....	75
3.11.6 Auswertung der Proteinabundanzen .....	75
<b>3.12 RNA-Interferenz .....</b>	<b>76</b>
3.12.1 Puffer und Lösungen für die RNA-Interferenz .....	76

3.12.2 Reduktion der Septin7-Expression durch RNA-Interferenz .....	77
<b>3.13 Blockade von CD166 auf der Oberfläche equiner PBL .....</b>	<b>78</b>
3.13.1 Puffer und Lösungen für die CD166-Blockade .....	78
3.13.2 Dialyse des anti-CD166-Antikörpers.....	78
3.13.3 Durchführung der CD166-Blockade.....	78
<b>3.14 Transmigrationsassay .....</b>	<b>79</b>
3.14.1 Puffer und Lösungen für den Transmigrationsassay .....	79
3.14.2 Durchführung der Transmigrationsassays Septin7-gesilencter und CD166- blockierter Zellen .....	79
<b>4 ERGEBNISSE .....</b>	<b>81</b>
<b>4.1 Charakterisierung der instabilen anti-Septin7-Antikörper-Klone .....</b>	<b>81</b>
4.1.1 Untersuchungen der instabilen Klone weisen auf unterschiedliche Bindungseigenschaften hin.....	81
4.1.1.1 Im Western Blot detektieren acht Klone Septin7 .....	81
4.1.1.2 Ein Klon detektiert Septin7 in der Durchflusszytometrie .....	82
4.1.2 Sieben Klone wurden für die Stabilisierung ausgewählt.....	84
<b>4.2 Nach der Stabilisierung liegen methodenspezifische Antikörper vor.....</b>	<b>85</b>
4.2.1 Untersuchungen der stabilisierten Klone bestätigen deren unterschiedliche Eignung für einzelne Methoden .....	85
4.2.1.1 Im Western Blot detektieren fünf stabile Klone equines Septin7 .....	85
4.2.1.2 Ein Klon detektiert Septin7 sehr gut in der Durchflusszytometrie .....	87
4.2.1.3 Drei der anti-Septin7-Antikörper-Klone können zur Detektion von equinem Septin7 in der Immunzytochemie eingesetzt werden .....	89
4.2.1.4 Drei Klone detektieren equines Septin7 in der Immunhistochemie .....	91
4.2.1.5 Sechs der sieben Klone reichern Septin7 in der Immunpräzipitation an .....	93
4.2.2 Fünf der acht stabilisierten Klone haben hervorragende Bindungseigenschaften an Septin7 des Pferdes .....	94
<b>4.3 Septin7 ist zwischen Blut- und intraokulären Lymphozyten bei der ERU differentiell reguliert .....</b>	<b>96</b>
4.3.1 Die Septin7-Expression ist in VL erhöht .....	96
4.3.2 Septin7-defiziente Zellen migrieren vermehrt durch equines RPE .....	100
<b>4.4 Identifikation von Septin7-Interaktoren .....</b>	<b>101</b>



4.4.1 Mittels Immunpräzipitation und Massenspektrometrie konnten potentielle Septin7-Interaktoren bestimmt werden .....	101
4.4.2 Vimentin und Laktotransferrin können als Interaktoren von Septin 7 des Pferdes verifiziert werden.....	103
4.4.3 Die bestätigten Septin7-Interaktoren sind auf peripheren und intraokulären Lymphozyten bei der ERU differentiell reguliert .....	105
4.4.3.1 Vimentin ist in VL niedriger exprimiert als in peripheren Lymphozyten .....	105
4.4.3.1 Die Laktotransferrin-Expression steigt in VL gegenüber peripheren Lymphozyten .....	108
<b>4.5 Identifikation differentiell exprimierter Proteine auf der Zelloberfläche peripherer und intraokulärer Lymphozyten bei an ERU erkrankten Pferden.....</b>	<b>111</b>
4.5.1 Die vergleichende Untersuchung der Proteome von peripheren Blut- und intraokulären Lymphozyten von ERU-Patienten ergab 146 differentiell regulierte Proteine .....	111
4.5.2 Bestätigung der differentiellen Expression von CD150 und CD166 auf peripheren und intraokulären Lymphozyten von ERU-Patienten.....	116
4.5.3 CD166 fördert die Migrationsfähigkeit equiner Lymphozyten .....	118
<b>5 DISKUSSION .....</b>	<b>119</b>
<b>6 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>148</b>
<b>7 SUMMARY .....</b>	<b>150</b>
<b>8 LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>152</b>
<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>176</b>

$\alpha$	alpha / Anti
$\beta$	beta
$\gamma$	gamma
$\varepsilon$	epsilon
$\mu\text{g}$	Mykrogramm
$\mu\text{l}$	Mykro iter
$\mu\text{M}$	Mykromolar
$\mu\text{m}$	M kromol
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
1D	Eindimensional
2D	Zweidimensional
Å	Ångström
Abb.	Abbildung
ABC	Ammoniumbicarbonat
ACN	Acetonitril
AIRE	Autoimmun-Regulator
AL AM	<i>engl.</i> Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule
APS	Ammoniumpersulfat
Arp	<i>engl.</i> Actin-related Protein
ARPC	Untereinheit des Arp2/3-Komplexes
ARPE	<i>engl.</i> American Retinal Pigment Epithelium
ATP	Adenosintriphosphat
BD	Becton Dickinson
BHS	Blut-Hirn-Schranke
bidest.	Zweifach destilliert
BL	Negativkontrolle, <i>engl.</i> Blank
BLAST	<i>engl.</i> Basic Local Alignment Search Tool
BRS	Blut-Retina-Schranke
BSA	Bovines Serumalbumin
$\text{CaCl}_2$	Kalziumchlorid
CAM	Zelladhäsionsmolekül, <i>engl.</i> Cell Adhesion Molecule
CAPZ	<i>engl.</i> Capping Protein (Actin Filament) Muscle Z-line
CCL	Chemokin (C-C motif) Ligand

CD	Cluster of Differentiation
Cdc	Cell Division Cycle
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
CID	Normalisierte Kollisionsenergie, <i>engl.</i> Collision Induced Dissociation
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CpG	Dinukleotid aus Cytosin und Guanin, verbunden durch Phosphat
CRALBP	<i>engl.</i> Cellular Retinaldehyde-binding Protein
CTLA	<i>engl.</i> Cytotoxic T Lymphocyte-associated Antigen
CXCR	Chemokin (C-X-C motif) Rezeptor
Cy5	Fluorochromfarbstoff Cyanin-5
Da	Dalton
DAPI	Diamidinphenylindol
dest.	Destilliert
DIGE	Differentielle Gelelektrophorese
DK	Differentialinterferenzkontrast-Aufnahme
DM	Dodecyl $\beta$ -D-maltosid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
Dr.	Doktor
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAE	Experimentelle Autoimmunenzephalitis
EAU	Experimentelle Autoimmunuveitis
ECL	<i>engl.</i> Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure, <i>engl.</i> Ethylenediaminetetraacetic Acid
ELISA	<i>engl.</i> Enzyme-linked Immunosorbent Assay
eq	Equin
ERU	Equine rezidivierende Uveitis
et al.	und Kollegen, <i>lat.</i> et alumni
FACS	Durchflusszytometrie, <i>engl.</i> Fluorescence-activated Cell Sorting
F-Actin	Filamentöses Actin
FASP	<i>engl.</i> Filter-aided Sample Preparation
FCA	Freund'sches komplettes Adjuvans, <i>engl.</i> Freund's Complete Adjuvant

FCS	Fötales Kälberserum, <i>engl.</i> Fetal Calf Serum
FDR	<i>engl.</i> False Discovery Rate
FITC	Fluorochromfarbstoff Fluorescein-Isothiocyanat
Fluo-Puffer	Fluoreszenzpuffer
FoxP3	Forkhead Box P3
FSC	Vorwärtsstreulicht, <i>engl.</i> Forward Scatter
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GATA-3	Th2-Zell spezifischer Transkriptionsfaktor, bindet die DNA-Sequenz GATA
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor, <i>engl.</i> G-Protein-coupled Receptor
gsd	Gesund
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosintriphosphat-spaltendes Enzym
H+L	Leichte und schwere Kette, <i>engl.</i> Heavy and Light Chain
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HAT	Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin Zellkulturmedium
HCl	Salzsäure
HEK	Menschliche embryonale Nierenzellen, <i>engl.</i> Human Embryonic Kidney Cells
HeLa	Humane Epitheloidzelllinie, entstanden aus Zellen von Henrietta Lacks
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, <i>engl.</i> High Performance Liquid Chromatography
hu	Human
HUVEC	Humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen, <i>engl.</i> Human Umbilical Vein Endothelial Cells
i.p.	Intraperitoneal
IA	Iodacetamid
ICAM	<i>engl.</i> Intercellular Adhesion Molecule
ICC	Immunzytochemie, <i>engl.</i> Immunocytochemistry
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
IP	Immunpräzipitation
IRBP	<i>engl.</i> Interphotoreceptor Retinoid Binding Protein

ITK	Isotypkontrolle
iT <sub>reg</sub>	Induzierbare regulatorische T-Zellen
Kap.	Kapitel
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
KHCO <sub>3</sub>	Kaliumhydrogencarbonat
LC-MS/MS	Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie, <i>engl.</i> Liquid Chromatography Mass Spectrometry/Mass Spectrometry
LFA	<i>engl.</i> Leukocyte Function-associated Antigen
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
LP	Lysepuffer
LPS	Lipopolysaccharid
LTF	Laktotransferrin
Ly	Lymphozyten
Lys-C	Lysyl Endopeptidase-Lösung
M	Molar
m/z	Masse/Ladungsverhältnis
mA	Milliampère
max.	Maximal
MDCK	Canine Nierenepithelzelllinie nach Madin und Darby, <i>engl.</i> Madin-Darby Canine Kidney Epithelial Cells
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
mgf	<i>engl.</i> Mascot Generic File
MHC	Hapthistokompatibilitätskomplex, <i>engl.</i> Major Histocompatibility Complex
mIgG	IgG aus der Maus
min	Minute
MK	Mediumkontrolle
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
MPO	Myeloperoxidase
MS	Multiple Sklerose

MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Natriumcarbonat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
NH <sub>4</sub> Cl	Ammoniumchlorid
nl	Nanoliter
NLRP	<i>engl.</i> NOD-like Receptor Family, Pyrin Domain Containing
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
nT <sub>reg</sub>	Natürliche regulatorische T-Zellen
OB	Oberflächenbiotinylierung
p	Signifikanzwert, <i>engl.</i> Probability Value
pAB	Polyklonaler anti-Septin7-Antikörper aus dem Kaninchen
PAK	<i>engl.</i> p21-activated Kinase
PBL	Periphere Blutleukozyten
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung, <i>engl.</i> Phosphat-buffered Saline
PBS-T	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, <i>engl.</i> Polymerase Chain Reaction
PE	Fluorochromfarbstoff Phycoerythrin
PMT	Photomultiplier Tube
PNGase	Peptid-N-Glykosidase
POD	Peroxidase
Pop	Population
ppm	<i>engl.</i> Parts per Million
Prof.	Professor
PTP	Protein-Tyrosin-Phosphatase
PTPN6	Protein-Tyrosine Phosphatase non-Receptor Type 6
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PVP	Polyvinylpyrrolidon
PVP-T	Polyvinylpyrrolidon in PBS-T
rabIgG	IgG aus dem Kaninchen
RAGE	<i>engl.</i> Receptor for Advanced Glycation Endproducts

rcf	Relative Zentrifugalbeschleunigung, <i>engl.</i> Relative Centrifugal Force
REC	Retinale Endothelzellen, <i>engl.</i> Retinal Endothelial Cells
rlgG	IgG aus der Ratte
RIPA	Radioimmunopräzipitationsassay
RNA	Ribonukleinsäure, <i>engl.</i> Ribonucleic Acid
RORyt	<i>engl.</i> Retinoic Acid-related Orphan Receptor gamma t
RPE	Retinales Pigmentepithel
rpm	Umdrehungen pro Minute, <i>engl.</i> Rounds per Minute
RPM	Zell kulturmedium entwickelt im Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
s.c.	Subkutan
SAP	<i>engl.</i> SLAM-associated Protein
SDS	Natriumdodecylsulfat, <i>engl.</i> Sodium Dodecyl Sulfate
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec	Sekunde
shRNA	<i>engl.</i> Short Hairpin RNA
SIGIRR	<i>engl.</i> Single Immunoglobulin and Toll-Interleukin 1 Receptor
siRNA	<i>engl.</i> Small Interfering RNA
SLAM	<i>engl.</i> Signaling Lymphocyte Activation Molecule
SLAMF	<i>engl.</i> Signaling Lymphocyte Activation Molecule Family
SSC	Seitwärtsstreulich, <i>engl.</i> Sideward Scatter
t	Detektionszeit
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung, <i>engl.</i> Tris-buffered Saline
TCR	T-Zell-Rezeptor, <i>engl.</i> T-cell Receptor
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure, <i>engl.</i> Trifluoroacetic Acid
TGF	<i>engl.</i> Transforming Growth Factor
T <sub>h</sub>	T-Helferzellen
TLR	<i>engl.</i> Toll-like Receptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TPM	Tropomyosin
T <sub>reg</sub>	Regulatorische T-Zellen

## Abkürzungsverzeichnis

---

UA	Urea A
UC	Urea C
VCAM	<i>engl.</i> Vascular Cell Adhesion Molecule
VDAC	Voltage-dependent Anion-selective Channel Protein
VE	Vaskulär-endothelial
VEGF	<i>engl.</i> Vascular Endothelial Growth Factor
vgl.	Vergleiche
VL	Vitreale Leukozyten
VLA	<i>engl.</i> Very Late Antigen
WB	Western Blot
x H <sub>2</sub> O	Hydrat
zlgG	IgG aus der Ziege
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZO	Zona occludens-Protein



# 1 EINLEITUNG

Die equine rezidivierende Uveitis (ERU) ist eine autoimmunmedierte, wiederkehrende Entzündung innerer Strukturen des Pferdeauges (Deeg et al. 2002b). Sie geht mit der schubweisen Transmigration autoaggressiver T-Zellen über die Blut-Retina-Schranke einher (Deeg et al. 2001), deren Barrierefunktion im Verlauf der Erkrankung sukzessive zerstört wird (Uhl et al. 2014).

Bereits in früheren Studien konnten wir einen Beitrag zur Aufklärung der Zielproteine leisten, gegen die die Autoreaktivität der Lymphozyten von an ERU erkrankten Pferden gerichtet ist (Deeg et al. 2006b, Deeg et al. 2007b, Deeg et al. 2004, Deeg et al. 2002b, Swadzba et al. 2012a). Die Ursache für die Reaktivität der beteiligten T-Zellen gegen körpereigene Antigene ist für die ERU und auch für andere Autoimmunerkrankungen bislang aber ungeklärt. Die Analyse differentiell exprimierter Proteine in Leukozyten von ERU-Patienten und augengesunden Kontrolltieren ergab funktionell hoch interessante Proteine (Degroote et al. 2014, Degroote et al. 2012), darunter den Integrinaktivator Talin1 oder die zytoskelettale GTPase Septin7 (Degroote et al. 2014, Degroote et al. 2012). Septin7 war interessanterweise in peripheren Blutlymphozyten von ERU-Patienten geringer exprimiert als in denen von Kontrolltieren (Degroote et al. 2014) und eine verringerte Septin7-Expression konnte in murinen T-Zellen mit einer erhöhten Transmigrationsrate *in vitro* assoziiert werden (Tooley et al. 2009). Da die Transmigration ein Schlüsselereignis der ERU darstellt (Degroote et al. 2013), war dieses Protein im Zusammenhang mit der ERU von besonderem Interesse für uns.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb, zu überprüfen, ob auch zwischen ins Auge transmigrierten und peripheren Lymphozyten von ERU-Tieren Expressionsunterschiede bezüglich Septin7 auszumachen sind und welche mögliche funktionelle Relevanz diese besitzen. Zusätzlich sollte mittels einer Analyse von Septin7-Interaktoren die Rolle von Septin7 für die komplexen pathophysiologischen Vorgänge bei der ERU beleuchtet werden. Zu diesem Zweck war es jedoch notwendig, vorher geeignete monoklonale Antikörper gegen equines Septin7 zu erzeugen, da sich der kommerziell verfügbare polyklonale Antikörper für die Immunpräzipitation von equinem Septin7 als ungeeignet erwiesen hatte.

Zusätzlich zur Spezifizierung der Rolle des intrazellulären Proteins Septin7 und damit assoziierter Proteine bei der ERU sollten durch diese Arbeit auch erstmals proteo-

misch differentiell regulierte Oberflächenproteine, welche von herausragender Bedeutung für immunologische Prozesse sind (Barreiro et al. 2007, Espino et al. 2014), auf intraokulären und peripheren Lymphozyten bei der ERU detektiert und dadurch Proteine mit möglicher pathogenetischer Bedeutung identifiziert werden.

## **2 LITERATUR**

### **2.1 Definition und Bedeutung der equinen rezidivierenden Uveitis**

#### **2.1.1 Uveitis**

Der Begriff Uveitis bezeichnet eine Entzündung der Uvea, der mittleren Augenhaut, welche den pigmentierten, vaskulären Mantel des Augapfels darstellt und aus Choroidea, Ziliarkörper und Iris besteht. Das klinische Bild von Uveitiden kann vielfältig sein. Sie lassen sich vom anatomischen Standpunkt aus in eine anteriore, intermediäre, posteriore und Panuveitis einteilen (Caspi 2010). Uveitiden lassen sich auf verschiedene Ursachen zurückführen, so treten sie beispielsweise als Begleitsymptom systemischer Infektionen oder anderer Erkrankungen auf (Caso et al. 2014, Schaftenaar et al. 2014). Bei nicht infektiösen Uveitiden liegen meist immunmedierte Mechanismen zugrunde (Caspi 2010). Dabei greift die Immunabwehr des Organismus körpereigene Strukturen an und verursacht so Entzündungen und Gewebeschäden (Caspi 2010, Zhao et al. 2014).

#### **2.1.2 Klinik und Therapie der ERU**

Die spontan auftretende, organspezifische Entzündung innerer Strukturen des Pferdeauges, die mit rezidivierenden Entzündungsschüben einhergeht, wird als equine rezidivierende Uveitis (ERU) bezeichnet (Gilger et al. 1999). Die ERU ist eine hochprävalente Erkrankung in der Pferdepopulation (Hines 1984). Sie stellt die Hauptursache von Erblindung beim Pferd dar (Fritz et al. 2014, Rebhun 1979, Schwink 1992) und besitzt insofern sowohl in wirtschaftlichen, als auch in tierschutzrechtlichen Belangen große Bedeutung, da bei vollständiger Erblindung die Euthanasie des Pferdes als Visus-orientiertem Tier indiziert ist (Gilger et al. 1999). Die Symptome der ERU umfassen unter anderem das Auftreten des Tyndall-Effekts in der vorderen Augenkammer, Hypopyon, Atrophie der Corpora nigra, Hyperpigmentation und Fibrose der Iris, Katarakt und Schäden an der Retina (Gilger et al. 2010). Die medikamentöse Therapie zielt vor allem auf die Reduktion der Entzündung ab (Curling 2011). Hierzu haben sich antiinflammatorische Wirkstoffe aus der Gruppe der Corticosteroide, wie Prednisolon und Dexamethason, oder der nicht-steroidalen Antiphlogistika, beispielsweise Flurbiprofen, Diclofenac oder Flunixin-Meglumin,

sowie andere Immunsuppressiva, darunter vor allem Ciclosporin (Curling 2011, Gilger et al. 2010) als wirkungsvoll erwiesen, welche topisch oder auch systemisch verabreicht werden können (Curling 2011). Unter dem Einfluss der immunsuppressiven Therapie klingen die klinischen Symptome bei den meisten Patienten innerhalb von zwei Wochen ab (Gilger et al. 2010). Unterschiedlich lange nach Ende des Therapieintervalls kommt es jedoch bei der ERU zur erneuten Ausbildung der Symptomatik mit von Schub zu Schub wachsender Beeinträchtigung der Funktion des Auges (Degroote et al. 2013, Gilger and Michau 2004). Die Schäden an der Neuroretina sind irreversibel (Deeg et al. 2002a), so dass die Krankheit häufig trotz medikamentöser Therapie in ihrem Verlauf zum Erlöschen des Augenlichts am betroffenen Auge führt (Gilger and Michau 2004).

Seit einigen Jahren wird zur Erhaltung des durch humane autoimmune Uveitis oder ERU bedrohten Sehvermögens ein operativer Eingriff, die Pars plana Vitrektomie, durchgeführt (Langner-Wegscheider and de Smet 2014, Werry and Gerhards 1992). Dabei wird der Glaskörper aus dem Auge abgesaugt und durch physiologische Kochsalzlösung ersetzt (Werry and Gerhards 1992). So werden gemäß den Autoren Visus-beeinträchtigende und entzündliche Infiltrate aus dem Auge entfernt und eine Verbesserung der klinischen Symptomatik sowohl im menschlichen Auge als auch in dem des Pferdes erzielt (Langner-Wegscheider and de Smet 2014, Werry and Gerhards 1992). Der Wirkmechanismus und die Langzeitergebnisse dieser Methode sind für die ERU noch unzureichend erforscht, es wird aber ein positiver Effekt auf die Häufigkeit und Intensität weiterer Entzündungsschübe angenommen (Fruhauf et al. 1998), welcher für die Pars plana Vitrektomie bei humaner Autoimmunuveitis bereits bestätigt werden konnte (Langner-Wegscheider and de Smet 2014).

### **2.1.3 Die ERU als Tiermodell**

Für die Erforschung pathophysiologischer Mechanismen der humanen autoimmunen Uveitis, einer häufigen Ursache für Erblindung des Menschen, sind Tiermodelle von herausragender Bedeutung. Bevorzugt werden bisher verschiedene Modelle eingesetzt, bei denen künstlich eine Uveitis ausgelöst wird (Caspi 2014). Da jedoch keines dieser Modelle das komplexe pathophysiologische Spektrum der spontanen Erkrankung widerspiegelt, wurden mehrere unterschiedliche Methoden der Auslösung der experimentellen autoimmunen Uveitis (EAU) etabliert, die jeweils einen Ausschnitt der spontanen Erkrankung der Erforschung zugänglich machen (Caspi

2010). Dabei handelt es sich einerseits um die genetische Manipulation von Mäusen, wie sie beispielsweise im Autoimmunregulator (AIRE)<sup>-/-</sup> Mausstamm vorliegt, durch die eine spontane, jedoch bezüglich des Zeitpunkts des Auftretens der Symptome unvorhersehbare Uveitis ausgelöst werden kann (Horai et al. 2013). Andererseits kann EAU auch durch Immunisierung von vor allem Ratten und Mäusen bestimmter Inzuchtstämme mit Freund'schem komplettem Adjuvans (FCA) und einem retinalen Antigen, das als Autoantigen der humanen autoimmunen Uveitis bekannt ist, wie Interphotoreceptor Retinoid Binding Protein (IRBP) oder S-Antigen, induziert werden (Caspi 2010). Eine Sonderform der Induktion ist der sogenannte adoptive Transfer, bei dem ein Tier wie oben beschrieben mit einem bekannten Autoantigen immunisiert wird, um die entstandenen autoreaktiven T-Zellen zu ernten und einem anderen, naiven Tier mit dem gleichen genetischen Hintergrund zu injizieren (Caspi 2010, Caspi et al. 1986). Durch Anwendung dieser Technik wurde die autoimmune Uveitis als T-Zell-medierte Erkrankung charakterisiert und gezeigt, dass weder autoreaktive B- noch Cluster of Differentiation (CD) 8<sup>+</sup> T-Zellen oder Autoantikörper in der Lage sind, EAU auszulösen (Caspi et al. 1986). Die Abhängigkeit der EAU von CD4<sup>+</sup> T-Zellen konnten später durch adoptiven Transfer autoreaktiver T-Zellen in CD4<sup>-/-</sup>-Mäuse, bei denen sich dadurch keine EAU auslösen ließ, untermauert werden (Agarwal and Caspi 2004).

Das Pferd stellt die einzige Spezies dar, bei der mit hoher Prävalenz spontan autoimmune Uveitiden auftreten (Deeg et al. 2002b, Hines 1984), ohne dass zuvor eine Manipulation der Immunantwort des Tieres durch den Menschen stattfindet. Das klinische Erscheinungsbild der ERU gleicht dem der humanen autoimmunen Uveitis und auch die Immunreaktionen beider Krankheiten laufen, soweit bisher erforscht, in sehr ähnlicher Weise ab (Deeg et al. 2011). So liegt in beiden Fällen eine Autoimmunreaktion des Patienten gegen retinale Autoantigene zugrunde, wie beispielsweise gegen S-Antigen (Deeg et al. 2001, Deeg et al. 2004, Diedrichs-Möhring et al. 2014, LeHoang et al. 2008), IRBP (Deeg et al. 2001, Deeg et al. 2002b, Diedrichs-Möhring et al. 2014, Horai et al. 2013) oder Cellular Retinaldehyde-binding Protein (CRALBP) (Deeg et al. 2006b, Deeg et al. 2007b). Da es sich bei der ERU um eine in der gesamten Pferdepopulation auftretende Erkrankung handelt (Gilger and Michau 2004), ist der Patientenpool sehr inhomogen, was bei an autoimmuner Uveitis erkrankten Menschen ebenso zutrifft (Chang and Wakefield 2002). Durch ihr spontanes Auftreten (Degroote et al. 2014) ist es möglich,

auslösende Mechanismen der ERU zu untersuchen, was ihre Qualifikation als Tiermodell verglichen mit experimentell induzierten Autoimmunerkrankungen (Caspi 2014) hervorhebt. Außerdem kann das Probenmaterial, anders als beim Menschen, bereits unmittelbar post mortem gewonnen werden (Deeg 2002a) ohne vorher einer Degradation durch Wartezeiten zu unterliegen. Alle Stadien der Erkrankung können untersucht werden, während Proben uveitischer Augen des Menschen nur im Endstadium gewonnen werden können (Tan et al. 2012). Zudem kann aus einem Pferdeauge durch seine Größe eine weit größere Menge an Probenmaterial extrahiert werden als aus Nager- oder Menschaugen. Dadurch können ERU-Proben auf unkompliziertem Weg (Deeg et al. 2002a) und in großer biologischer Vielfalt beschafft werden, was im Gegensatz zu den in Inzuchtstämmen von Mäusen oder Ratten induzierten experimentellen Modellen steht (Caspi 2014). Die Ergebnisse der Forschung zu den komplizierten Pathomechanismen der ERU bieten also eine optimale Grundlage zur Aufklärung der Pathogenese der humanen Autoimmunerkrankung und sind, zusätzlich zur Aufklärung der ERU selbst, auch deshalb von außerordentlicher Bedeutung (Deeg et al. 2007b).

## **2.2 Immunpathophysiologie der ERU**

### **2.2.1 Rezidiventstehung**

Im Zuge der ERU kommt es zur Einwanderung verschiedener Entzündungszellen in das Zielorgan Auge (Deeg et al. 2001, Gilger et al. 1999). Dies geschieht in unregelmäßig wiederkehrenden Episoden akuter Entzündung, die sich mit klinisch häufig unauffälligen Phasen abwechseln (Gilger et al. 1999, Zipplies et al. 2009). Bei den migrierenden Entzündungszellen handelt es sich vorwiegend um T-Lymphozyten (Deeg et al. 2001, Gilger et al. 1999, Romeike et al. 1998). Der Angriff auto-aggressiver T-Lymphozyten auf retinale Antigene (Deeg et al. 2001) und der Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke (Gilger et al. 1999, Uhl et al. 2014) führen mit zunehmender Anzahl der Rezidive der ERU schließlich zu schwerwiegenden Schäden an der Neuroretina und letztendlich zu Blindheit (Deeg et al. 2002a, Gilger et al. 2010). Im Allgemeinen existieren einige mögliche Erklärungen für die rekurrente Natur von Autoimmunerkrankungen, darunter das Phänomen der molekularen Mimikry, bei der zwischen Epitopen zweier unterschiedlicher Proteine eine so starke Ähnlichkeit besteht, dass es zu Verwechslungen dieser kommen kann (Gatselis et al.

2015). Die molekulare Mimikry ist ein möglicher Mechanismus zur Rezidiventstehung bei Autoimmunerkrankungen, da Autoimmunreaktionen gegen Autoantigene durch Sequenzhomologien zwischen externen und körpereigenen Proteinen ausgelöst werden können (Gatselis et al. 2015). Das Peptid B:11-23<sup>R22E</sup> von humanem Insulin besitzt beispielsweise Ähnlichkeiten mit bestimmten Antigensequenzen verschiedener Mikroorganismen, die unter anderem aus Geflügel und Milchprodukten isoliert werden konnten. Wie Yang und Kollegen zeigten, wurden diese körperfremden Antigensequenzen von B:11-23<sup>R22E</sup>-spezifischen humanen T-Zellen erkannt (Yang et al. 2014). Die Autoren gingen deshalb davon aus, dass die molekulare Mimikry zwischen B:11-23<sup>R22E</sup> und mikrobiellen Sequenzen einen wichtigen Pathomechanismus des Typ I-Diabetes darstellt (Yang et al. 2014). Eine weitere Hypothese zur Entstehung von Rezidiven autoimmuner Erkrankungen beschäftigt sich mit der Aktivierung sogenannter Bystander-Zellen. Sie besagt, dass die Schwere von autoimmunen Entzündungsschüben nicht allein durch autoreaktive T-Zellen bestimmt wird, sondern auch die Aktivierung nicht-Antigen-spezifischer Leukozyten (Bystander-Zellen) maßgeblich zur Klinik beiträgt. So konnte in einer Studie an kongenital athymischen Ratten gezeigt werden, dass bei Induktion von EAU durch adoptiven Transfer autoreaktiver T-Zellen ein Krankheitsbild mit stark verändertem Zellinfiltrat auftritt, welches vor allem aus Mono- und Granulozyten besteht (Caspi et al. 1993). In IRBP-immunisierten Mäusen konnte außerdem festgestellt werden, dass autoreaktive T-Zellen eine andere Zytokinausstattung besaßen als nicht-Autoantigen-spezifische Bystander-T-Zellen. Dies führte zu einer Modulation der Immunantwort, die die uveitogene Aktivität der Antigen-spezifischen T-Zellen neutralisierte (Nian et al. 2012). Ein weiteres wichtiges Phänomen, welches an der Rezidiventstehung bei Autoimmunerkrankungen, beispielsweise der experimentell induzierten Autoimmunuveitis des Pferdes, beteiligt ist (Deeg et al. 2002b), wird als Epitop Spreading bezeichnet. Dabei verschiebt sich das Target der Immunantwort von einem initial angegriffenen Epitop auf ein Epitop desselben (intramolekulares Spreading) oder eines anderen Antigens (intermolekulares Spreading) (Deeg et al. 2006a). In einer Studie an sieben Pferden mit durch IRBP-Immunisierung induzierter Uveitis konnte das Epitop Spreading von Peptiden von IRBP hin zu solchen von S-Antigen beobachtet werden (Deeg et al. 2002b). Bei acht Pferden mit spontan aufgetretener ERU wurde außerdem eindrücklich belegt, dass Epitop Spreading Rezidive der Uveitis in dieser Spezies verursachen kann (Deeg et

al. 2006a). Dies erfolgte durch den Nachweis, dass die ursprünglich gegen bestimmte Epitope von S-Antigen gerichtete T-Zell-Antwort im Laufe der Zeit auf andere S-Antigen-Epitope oder auf Epitope von IRBP übergang und das ursprüngliche Autoantigen nicht länger targetiert wurde (Deeg et al. 2006a).

## 2.2.2 Verschiedene Möglichkeiten der T-Zellantwort

Für die Pathogenese der meisten organspezifischen Autoimmunerkrankungen, wie beispielsweise des Lupus nephritis (Qiao et al. 2015), des Diabetes mellitus Typ I (Moran-Auth et al. 2015) und auch der ERU (Deeg et al. 2001, Degroote et al. 2014) sind  $CD4^+$  Zellen (T-Helferzellen ( $T_h$ )) von herausragender Bedeutung. Diese können weiter in mehrere bedeutende Subpopulationen mit unterschiedlichem Phänotyp und verschiedenen Funktionen eingeteilt werden (Geginat et al. 2014). Im Jahr 1986 wurden bei Mäusen erstmals zwei differenzierte Subpopulationen von T-Helferzellen beschrieben und als  $T_h1$ - und  $T_h2$ -Zellen bezeichnet, welche vorrangig entweder Interferon ( $IFN$ ) $\gamma$  oder Interleukin ( $IL$ )-4 sekretierten (Mosmann et al. 1986). Spätere Forschungen am Nagermodell und bei Menschen ergaben eine weitaus komplexere Einteilung. So sind heute für  $CD4^+$  Zellen, die verschiedene Marker-Zytokine exprimieren - zusätzlich zu  $T_h1$ - und  $T_h2$ -Zellen - die Subpopulationen  $T_h3$ - (Marker-Zytokin Transforming Growth Factor ( $TGF$ ) $\beta$ ),  $T_h6$ - ( $IL$ -6),  $T_h7$ - (Forkhead Box P3 ( $FoxP3$ )/ $CD25$ ),  $T_h9$ - ( $IL$ -9/ $IL$ -21),  $T_h10$ - ( $IL$ -10),  $T_h17$ - ( $IL$ -17),  $T_h22$  ( $IL$ -22) und folliculäre T-Helferzellen ( $T_{FH}$ ; Chemokin (C-X-C motif) Rezeptor ( $CXCR$ )5) bekannt. Bei letzteren handelt es sich um Antigen-erfahrene T-Zellen in der Peripherie von B-Zellfollikeln in lymphoiden Organen, welche in einer Studie beim Menschen die B-Zellen in ihrer Umgebung zur Antikörperproduktion anregten (Schaerli et al. 2000). Regulatorische T-Zellen ( $T_{reg}$ ) des Menschen sind für die Etablierung einer Toleranz gegenüber körpereigenen Antigenen verantwortlich. Sie können natürlich vorkommen oder induziert werden (Kristensen et al. 2014). Humane natürliche (n) $T_{reg}$  sind  $T_h7$ -Zellen und somit  $FoxP3^+CD25^+$  (Zold et al. 2011). Durch Induktion entstehen unter anderem bei Mäusen induzierte (i) $T_{reg}$ , unter denen zwei Populationen bekannt sind, welche beispielsweise die  $CD8$ -induzierte Tumorzelllyse blockieren (Terabe et al. 2003). Dabei handelt es sich zum einen um die  $T_h3$ -Zellen, die beim Menschen  $TGF\beta$  sekretieren (Duran-Aniotz et al. 2013) und zum anderen um die  $T_h10$ -Zellen, die in der gleichen Spezies durch  $IL$ -10 gekennzeichnet sind (Kristensen et al. 2014). Die übrigen T-Helferzell-Subpopulationen,  $T_h1$ ,  $T_h2$ ,  $T_h6$ ,



T<sub>h</sub>9, T<sub>h</sub>17 und T<sub>h</sub>22, besitzen beim Menschen verschiedene Funktionen, die stark von ko-exprimierten Faktoren, wie IL-2 und Tumor-Nekrosefaktor (TNF) $\alpha$  abhängen (Azizi-Semrad et al. 2010, Raphael et al. 2014). Für die Entstehung von T-Zell-medierten Autoimmunerkrankungen des Menschen sind besonders die T<sub>h</sub>1-, T<sub>h</sub>9- und T<sub>h</sub>17-Zellen von Bedeutung (Antonelli et al. 2015, Raphael et al. 2014).

T<sub>h</sub>1-Zellen produzieren vorrangig die Zytokine IFN $\gamma$ , IL-2 und TNF (Raphael et al. 2014), die Phagozyten und zytotoxische T-Zellen anregen (Feldmann and Steinman 2005, Gilger et al. 1999, Mosmann et al. 1986). Sie werden im Mausmodell durch IL-12 induziert (Luger et al. 2008) und vermitteln eine vorrangig proinflammatorische Immunantwort, vor allem gegen intrazelluläre Erreger (Mosmann et al. 1986).

T<sub>h</sub>9-Zellen produzieren bei Mensch und Maus die Marker-Zytokine IL-9 und IL-21 (Chang et al. 2010, Jager et al. 2009). IL-9 unterstützt die Differenzierung von T<sub>h</sub>17-Zellen, während es gleichzeitig die Aktivität von T<sub>reg</sub> reduziert (Elyaman et al. 2009, Nowak et al. 2009). IL-21 wird beim Menschen auch von T<sub>h</sub>1 und T<sub>h</sub>17-Zellen produziert (Caruso et al. 2009) und induziert in Mäusen außerdem ebenfalls eine T<sub>h</sub>17-Antwort (Zhou et al. 2007)

T<sub>h</sub>17-Zellen sind maßgeblich an der Genese der experimentellen Autoimmunenzephalitis (EAE) bei Mäusen beteiligt (Cua et al. 2003). Durch Knock-Out des Gens für den T<sub>h</sub>17-Induktor IL-23 konnte eine Immunität der Tiere gegen die Induktion der EAE mit Hilfe des MOG35–55-Peptids verursacht werden (Cua et al. 2003). Eine Beteiligung der T<sub>h</sub>17-Antwort an der Pathogenese wurde auch für andere Autoimmunerkrankungen, wie die autoimmune Uveitis des Menschen im Rahmen der Behçet-Krankheit, nachgewiesen (Kim et al. 2010).

Interessanterweise gibt es Belege für die Ko-Expression bestimmter Marker-Zytokine auf ein und derselben Zelle, wodurch die Funktionen bestimmter T-Helferzell-Subtypen im Immungeschehen bei Entzündungen neu definiert wurden (Raphael et al. 2014). Beispielsweise konnte unter Einfluss von TNF $\alpha$  eine Umwandlung humaner T<sub>h</sub>17-Zellen in sogenannte nicht-klassische T<sub>h</sub>1-Zellen, die sowohl IL-17 als auch IFN $\gamma$  produzierten (Geginat et al. 2014, Maggi et al. 2012), nachgewiesen werden (Cosmi et al. 2014). Diese lösten eine aggressivere T<sub>h</sub>1-Antwort aus, beispielsweise bei der juvenilen idiopathischen Arthritis (Maggi et al. 2012), als die klassische Variante dieser Population (Cosmi et al. 2014). Die genauen Mechanismen, die zur Ausbildung und Aufrechterhaltung von

Autoimmunerkrankungen führen, sind also möglicherweise noch komplexer als bisher angenommen und bedürfen nach wie vor weiterer Untersuchung.

## **2.3 Infiltration immunprivilegierter Gewebe**

### **2.3.1 Die Blut-Hirn-Schranke**

Verschiedene Organe besitzen einen besonderen Status bezüglich ihrer Erreichbarkeit durch das Immunsystem (Medawar 1948). Es handelt sich dabei unter anderem um den Hoden, die Plazenta, das zentrale Nervensystem (ZNS) und das Auge (Benhar et al. 2012).

Im Jahr 1885 publizierte Paul Ehrlich erstmals einen Hinweis auf das Vorhandensein einer Blut-Hirn-Schranke (BHS), nachdem er Ratten intravenös Trypanblau injiziert hatte (Ehrlich 1885). Aus der Tatsache, dass er das Gehirn bei der Sektion unangefärbt vorfand, zog er jedoch den Fehlschluss, dass das Gehirn nicht mit Trypanblau anfärbbar sei (Ehrlich 1885), was Goldmann 1913 widerlegte (Goldmann 1913). Dieser injizierte Hunden denselben Farbstoff direkt in den Liquor cerebrospinalis und erreichte damit eine Anfärbung zentralnervöser Strukturen (Goldmann 1913). So war erstmals der Nachweis geführt, dass dem ZNS eine Sonderrolle zufällt, die es von den regulären Verteilungsmechanismen von Stoffen im Organismus ausnimmt. Trypanblau konnte aus der Peripherie nicht über die Barriere des ZNS diffundieren.

In neuerer Zeit wurden der Aufbau und die Eigenschaften der BHS genauer charakterisiert. Sie besteht aus den Endothelzellen der zentralnervösen Blutgefäße, die an ihrer basalen Seite von glatten Muskelzellen und einer durchbrochenen Schicht von Perizyten eingefasst werden (Daneman 2012). Der Endothelzellverband der Gefäße des ZNS unterscheidet sich stark von dem an peripheren Gefäßen (Daneman 2012). Es bestehen hier weitaus stärkere interzelluläre Tight Junctions (Zonulae occludentes) zwischen den einzelnen Zellen als zwischen peripheren Endothelzellen, wodurch die Bewegung von Ionen, Molekülen und Zellen auf parazellulärem Weg eingeschränkt wird (Daneman 2012). Auch die transzelluläre Passage ist durch einen Mangel an Fenestrae und verminderte Pinozytoseaktivität im Vergleich zu peripheren Endothelien verringert (Daneman 2012). Die Perizyten, die mit Hilfe von fingerartigen Ausläufern ein Netz auf der basalen Seite der Endothelzellen bilden, bekleiden wichtige Funktionen bezüglich der Homöostase des ZNS (Winkler et al. 2011). Sie regulieren die Durchlässigkeit der BHS, den Blutdruck in den zentralnervösen

Gefäßen und die Aufrechterhaltung der Gefäßarchitektur (Winkler et al. 2011). Abluminal dieser Zellen befindet sich die Basalmembran, die im ZNS aus zwei Schichten besteht (Daneman 2012). Perizyten und Endothelzellen besitzen eine gemeinsame Basalmembran, während die zweite Schicht das Fundament des neuronalen Gewebes, vor allem der Astrozyten, darstellt (Daneman 2012). Die Astrozyten bilden die Verbindung zwischen Synapsen und Gefäßen und vermitteln so die Regulation des Transports von Blut und den darin enthaltenen Stoffen in Abhängigkeit von der Aktivität des entsprechenden Hirn- oder Rückenmarksareals (Daneman 2012). Das ZNS beherbergt nur eine geringe Zahl von Immunzellen (Ransohoff and Engelhardt 2012). Darunter befinden sich Makrophagen, welche aus dem Blut in das neuronale Gewebe einwandern, um dort anfallenden Zelldebris zu eliminieren (Daneman 2012). Diese Zellen werden langsam aber stetig aus dem peripheren Pool ersetzt (Daneman 2012). Im ZNS residente Immunzellen sind die Mikrogliazellen, die bereits während der Embryonalentwicklung einwandern und im Lauf des Lebens nicht aus der Peripherie ersetzt werden (Perdiguerro et al. 2014, Ransohoff and Engelhardt 2012). Deren Funktion besteht in der Aufrechterhaltung eines immunsuppressiven Milieus auf der ZNS-Seite der BHS (Ransohoff and Engelhardt 2012) und der Regulation der Transmigration peripherer Immunzellen über diese Schranke, falls eine Entzündungsreaktion notwendig wird (Daneman 2012). In diesem Fall präsentieren Mikrogliazellen Antigene an infiltrierende B- und T-Lymphozyten (Daneman 2012). Verschiedene Zytokine, Chemokine und andere immunologisch aktive Substanzen beeinflussen den Transport von molekularen Stoffen und Zellen aus dem peripheren Blutkreislauf ins ZNS (Deli et al. 1995, Lee et al. 2012, Pan and Kastin 2002, Rom et al. 2015). So wurde beispielsweise die Aktivität des Medikamententransporters P-Glykoprotein im Zellkulturmodell von humanen Neuroendothelzellen durch die proinflammatorischen Zytokine IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  reduziert (Lee et al. 2012). TNF $\alpha$  wirkte über spezifische Rezeptoren (Pan and Kastin 2002) auf die Endothelzellen der BHS ein und erhöhte deren Permeabilität für kleinmolekulare Stoffe wie Sucrose oder Inulin im Zellkulturmodell (Deli et al. 1995) und im experimentellen Mausmodell auch für Leukozyten (Rom et al. 2015).

### 2.3.2 Die Blut-Retina-Schranke

Wie das ZNS besitzt auch das Auge den Status eines immunprivilegierten Organs (Schroedl et al. 2014) und auch hier kann es zum Verlust dieser privilegierten Stellung durch Beeinträchtigung der Grenze zwischen Auge und peripherem Blutkreislauf, der Blut-Retina-Schranke (BRS), kommen (Hofmaier et al. 2011). Die BRS besteht aus einer inneren und einer äußeren Zellschicht (Arredondo Zamarripa et al. 2014), wobei die äußere BRS von besonderer Bedeutung für die Erhaltung von Gesundheit und Integrität der Retina ist (Economopoulou et al. 2009). Die innere BRS ähnelt der BHS bezüglich ihrer Transport- und Barrierefunktionen (Tagami et al. 2009) und wird wie diese von Endothelzellen gebildet, welche durch besonders starke Tight Junctions verbunden sind (Arredondo Zamarripa et al. 2014). Die äußere BRS besteht hingegen aus den Zellen des retinalen Pigmentepithels (RPE), die das Immunprivileg des Auges zusätzlich schützen (Crane and Liversidge 2008). Interessanterweise besitzt das Pferd eine weitgehend avaskuläre Retina, so dass bei dieser Spezies keine nennenswerte innere BRS ausgebildet ist (Uhl et al. 2014). RPE-Zellen als Ansässige eines immunprivilegierten Organs besitzen unter physiologischen Bedingungen eine antiinflammatorische Wirkung (Chen et al. 2014). Beispielsweise konnte an primären menschlichen RPE-Zellen eine Sekretion von löslichem Intracellular Adhesion Molecule (ICAM)-1, einem Adhäsionsmolekül, das in der Regel auf der Oberfläche von Epi- und Endothelzellen exprimiert wird und die Adhäsion von Leukozyten begünstigt, nachgewiesen werden (Wallace et al. 2013). In löslicher Form stand ICAM-1 bei Mäusen in Substratkonkurrenz mit seinem Membran-assoziierten Äquivalent (Wang et al. 2005), wodurch die Adhäsion von Leukozyten über eine Verminderung der Aktivität von Chemokin (C-C motif) Ligand (CCL) 3 und CCL4 gehemmt wurde (Wallace et al. 2013). Zudem exprimieren RPE-Zellen CD73, wie in einer Studie an B10RIII-Mäusen gezeigt werden konnte, bei denen mittels IRBP-Immunisierung eine EAU induziert wurde (Chen et al. 2014). CD73 konvertiert extrazelluläres Adenosintriphosphat (ATP), welches eine proinflammatorische Wirkung hat, zu antiinflammatorisch wirkendem Adenosin und hemmt so das Entzündungsgeschehen (Deaglio et al. 2007).

Neben ihren wichtigen antiinflammatorischen Eigenschaften zur Aufrechterhaltung des Immunprivilegs sind RPE-Zellen auch ein wichtiger Bestandteil der Immunantwort des Auges im Fall einer Entzündung (Detrick and Hooks 2010). Humane RPE-Zellen exprimieren wichtige Rezeptoren, wie Toll-like Rezeptor (TLR)-3, der bei

seiner Aktivierung im Rahmen einer Entzündung unter anderem IL-6 induziert (Kumar et al. 2004), das als wichtiger Induktor von  $T_H17$  bei der murinen EAU nachgewiesen werden konnte (Mesquida et al. 2014). Außerdem exprimieren RPE-Zellen auf ihrer Oberfläche Haupthistokompatibilitätskomplexe (MHC) vom Typ II, deren Anzahl bei Aktivierung der Zellen durch IFN $\gamma$  in einer Kultur von American Retinal Pigment Epithelium (ARPE)-19-Zellen (Makhoul et al. 2012) bzw. bei spontaner ERU (Romeike et al. 1998) stark zunahm. RPE-Zellen stellen die Zellpopulation mit der höchsten Phagozytoseaktivität des menschlichen Körpers dar (Mazzoni et al. 2014) und nutzen die MHC II-Moleküle auf ihrer Oberfläche zur Präsentation phagozytierter Antigene (Chen et al. 2014). RPE-Zellen von Lewis-Ratten konnten durch die von MHC II präsentierten Antigene entweder immunsuppressiv oder immunstimulierend auf T-Zellen wirken (Sun et al. 2003). Nicht aktivierte RPE-Zellen, die nur wenige MHC II-Moleküle exprimieren, wirkten inhibitorisch auf die Proliferation und TNF $\alpha$ -Produktion von T-Zellen (Sun et al. 2003) und unterdrückten im Mausmodell die Entwicklung von  $T_H1$ - und  $T_H17$ -Antworten (Gregerson et al. 2007). Die Expressionssteigerung von MHC II bei der Aktivierung von RPE-Zellen führte hingegen bei Ratten mit EAU (Sun et al. 2003) und bei primären humanen RPE-Zellen in Zellkultur (Enzmann et al. 2001) zu einer Aktivierung von T-Zellen. Sun et al. konnten zeigen, dass dabei speziell Antigen-spezifische autoreaktive T-Zellen durch MHC II auf RPE Zellen aktiviert wurden (Sun et al. 2003). Diese Erkenntnisse zeigen, dass aktivierte RPE-Zellen durch Induktion einer autoreaktiven Immunantwort aktiv zur Pathogenese der EAU und auch der humanen autoimmunen Uveitis beitragen können (Enzmann et al. 2001, Sun et al. 2003), aber ohne erfolgte Aktivierung ebenso an der Entzündungshemmung und Toleranzinduktion beteiligt sind (Gregerson et al. 2007). Der genaue Mechanismus der Aktivierung von RPE-Zellen im Rahmen autoimmuner Uveitiden ist bisher ungeklärt.

### **2.3.3 Transmigration von Lymphozyten über Barrieren immunprivilegierten Organe**

Die Transmigration von peripheren Blutleukozyten über Barrieren immunprivilegierten Gewebe wird durch starke Tight Junctions zwischen den Zellen der Barriere und verschiedene Mechanismen zur Gewährleistung des Immunprivilegs erschwert, um den privilegierten Status des Organs aufrecht zu erhalten (von Wedel-Parlow et al. 2011). Bisher ist ungeklärt, ob im Rahmen der ERU, bei der die Transmigration von Leukozyten ins Auge als immunprivilegiertes Organ die ausschlaggebende Rolle spielt, die BRS zur Transmigration dieser Zellen bereits geschädigt sein muss oder ob die Zerstörung dieser erst durch Infiltration der Leukozyten initiiert wird (Degroote et al. 2013).

Es sind nur wenige Studien darüber verfügbar, inwiefern die Proteinexpression von Lymphozyten Einfluss auf deren Transmigrationsfähigkeit über die BRS hat (Devine et al. 1996, Mesri et al. 1994, Whitcup et al. 1993). Das am häufigsten untersuchte Protein in diesem Zusammenhang ist das Integrin Leukocyte Function-associated Antigen (LFA)-1, auch als CD11a/CD18 bezeichnet, welches bei Ratten vom PVG-Stamm konstitutiv auf T-Lymphozyten exprimiert wird und für die Interaktion mit dem Adhäsionsmolekül ICAM-1 auf RPE- und retinalen Endothelzellen (REC) dieser Tiere gezeigt werden konnte (Mesri et al. 1994). Nach Blockade von LFA-1 mittels monoklonaler Antikörper verbesserte sich die klinische Symptomatik der IRBP-induzierten EAU in B10.A-Mäusen (Whitcup et al. 1993) und die IL-1- und TNF $\alpha$ -Sekretion durch T-Zellen von PVG-Ratten nahm ab (Mesri et al. 1994). Die Arbeitsgruppe um Devine beschrieb ein weiteres Integrin auf der Oberfläche von Lymphozyten von Lewis-Ratten, das Very Late Antigen (VLA)-4 oder CD49d/CD29 (Devine et al. 1996). VLA-4 kam auf naiven T-Zellen nicht vor, sondern wurde erst nach Aktivierung dieser exprimiert und vermittelte dann die Adhäsion der aktivierten Lymphozyten an RPE und REC von PVG-Ratten über das Adhäsionsmolekül Vascular Cell Adhesion Molecule (VCAM)-1 (Devine et al. 1996). Für ein weiteres wichtiges Lymphozytenprotein, Septin7, konnte in der murinen D10.G4-T-Zelllinie ebenfalls bereits eine Beteiligung an Transmigrationsprozessen nachgewiesen werden (Tooley et al. 2009). In einer Studie unserer Arbeitsgruppe zum equinen Lymphozytenproteom wurde die interessante Entdeckung gemacht, dass T-Zellen von an ERU erkrankten Tieren eine auf 62% reduzierte Expression dieses zytoskelettalen Proteins aufwiesen (Degroote et al. 2014). Die Untersuchung der

Relevanz dieser Daten für die Transmigration der Zellen über die BRS von ERU-Patienten ist bisher ungeklärt und Gegenstand dieser Arbeit.

### **2.3.3.1 Die Leukozyten-Adhäsionskaskade**

In Zellkultur ist es möglich, Zellen der humanen Jurkat-T-Zelllinie mittels verschiedener Chemokine, wie dem Stromal Cell-derived Factor 1 $\alpha$ , der an den Rezeptor CXCR4 an der Jurkat-Zell-Oberfläche bindet, zur Chemotaxis und Migration anzuregen (Nath et al. 2014). Der Vorgang der Transmigration über Endothelien an nicht-immunprivilegierten Organen beginnt mit dieser Chemotaxis und läuft in mehreren aufeinander aufbauenden Schritten ab (Pulli and Chen 2014). Als erstes nähern sich zirkulierende Immunzellen, initiiert durch die Expression von Selektinen auf Endothelzellen, dem Endothel an und beginnen, sich an ihm entlang zu bewegen (Rolling), wie im Mausmodell gezeigt werden konnte (Eriksson et al. 2001). Die Bewegung wird dann durch die Interaktion von auf der Leukozytenoberfläche exprimierten Integrinen, wie LFA-1, und ihren Liganden auf den Endothelzellen, den Zelladhäsionsmolekülen (CAM), vor allem ICAM-1 (Hepper et al. 2012), und weiteren Selektinen (Stadtman et al. 2011), verlangsamt und kommt schließlich zum Stillstand (Arrest). Die Aktivierung der beteiligten Integrine erfolgte im Mausmodell über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR), die während des Rollings der Leukozyten am Endothel auf Chemokine reagierten (Zarbock et al. 2007). Nach dem Anhaften an einer Stelle des Endothels beginnt die Suche nach einer geeigneten Austrittsstelle aus dem Blutgefäß (Crawling) (Phillipson et al. 2006). Ist diese gefunden, wird durch Chemokin-sensible GPCR und durch Integrine, die mit CAM interagieren, die Transmigration initiiert (Green et al. 2006, Zarbock et al. 2007). Ob diese Mechanismen bei der Transmigration über die Barrieren immunprivilegierten Organe in gleicher Weise stattfinden und welche die auslösenden Stimuli dafür sind, ist bisher ungeklärt.

### 2.3.3.2 Initiation und Ablauf der Transmigration

Leukozyten können entweder trans- oder parazellulär transmigrieren (Abadier et al. 2014). Beispielsweise bewirkt die Bindung von endothelialen Faktoren wie ICAM-1 an aktivierte Leukozyten die Ausbildung einer transzellulären Pore, durch die der entsprechende Leukozyt das Endothel durchdringen kann (Omri et al. 2011). Durch humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen (HUVEC), das Modell für periphere Endothelien, transmigrierten nur etwa 10% der Leukozyten auf diesem transzellulären Weg (Carman et al. 2007). Überraschenderweise ist allerdings in den Gefäßen der Barrieren an immunprivilegierten Organen die transzelluläre Passage von weitaus größerer Bedeutung, da hier durch die stärker ausgeprägten interzellulären Verbindungen eine parazelluläre Transmigration erschwert ist (Engelhardt and Ransohoff 2012). Die parazelluläre Transmigration wird durch die Internalisierung von Molekülen reguliert, über die aneinander angrenzende Endothelzellen zuvor miteinander in Verbindung standen. Im RPE handelt es sich bei diesen Verbindungen um Zonulae adhaerentes, die vor allem durch Cadherin gebildet werden (Narimatsu et al. 2013), und Zonulae occludentes (Tight Junctions), welche in ARPE-19-Zellen unter anderem aus Zonula occludens-Protein (ZO)-1, Occludin und Claudin-1 bestehen (Rosales et al. 2014). Die genauen Abläufe der Transmigration über das RPE in uveitischen Augen sind bislang ungeklärt. In einer Studie an Mäusen zur Untersuchung der Abläufe zur Transmigration von Leukozyten über Lungenendothelzellen konnten allerdings wertvolle Erkenntnisse gewonnen werden (Broermann et al. 2011). Binden aktivierte Leukozyten an das Endothel, zum Beispiel über den Vascular-endothelial Growth Factor (VEGF), der auch auf ARPE-19-Zellen gefunden wurde (Tan et al. 2015), werden bestimmte Moleküle der Zonulae adhaerentes und occludentes internalisiert und geben so den Weg für die Diapedese des Leukozyten frei (Chichger et al. 2014). Ein solches Molekül der Zonulae adhaerentes war im Mausmodell von Lungenendothelzellen VE-Cadherin, das im konstitutionellen Zustand mit einer Phosphatase, der vaskulär-endothelialen Protein-Tyrosin-Phosphatase (VE-PTP), assoziiert war (Broermann et al. 2011). Im Fall der Adhärenz eines aktivierten Leukozyten in der Nähe der entsprechenden Zonula adhaerens dissoziierte VE-PTP von VE-Cadherin ab und letzteres wurde phosphoryliert (Broermann et al. 2011). Dadurch kam es zur reversiblen Endozytose von VE-Cadherin und zur Lösung der interzellulären Verbindung (Chichger et al. 2014).



### 2.3.4 Phänotyp infiltrierender Lymphozyten bei autoimmuner Uveitis

Autoimmune Uveitiden im Nagermodell und die ERU des Pferdes sind T-Zell-medierte Erkrankungen (Caspi 2003, Regan et al. 2012). Obwohl im Nagermodell auch Antigen-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Lage waren, eine Uveitis auszulösen (Shao et al. 2004), wurde gezeigt, dass nur der Knock-Out von CD4, nicht aber der von CD8, die Entstehung der EAU durch Induktion mittels IRBP verhindern konnte (Calder et al. 1993, Caspi 2010). Lange Zeit wurde angenommen, dass der T<sub>h</sub>1-Phänotyp der CD4<sup>+</sup> T-Zellen allein für die Pathogenese autoimmuner Uveitiden in Nagern verantwortlich ist (Caspi 2010). Dies wurde im Mausmodell jedoch durch eine Untersuchung widerlegt, die ein Zusammenspiel von T<sub>h</sub>1-Zellen und den IL-17-produzierenden T<sub>h</sub>17-Zellen impliziert (Luger et al. 2008). Im Rahmen dieser Studie wurde die Ausprägung von EAU in B10.RIII Mäusen mit Gen-Knock-Outs für IL-12, IFN $\gamma$ , IL-17 oder IL-23 mit der in Wildtypmäusen des gleichen Stammes verglichen (Luger et al. 2008). IL-12 ist ein Induktor von T<sub>h</sub>1-Zellen, die wiederum IFN $\gamma$  sekretieren (Verma et al. 2014). IL-17 ist das Marker-Zytokin der T<sub>h</sub>17-Zellen, die von IL-23 induziert werden (Cua et al. 2003). Luger et al. erkannten, dass in naive Mäuse transferierte, aktivierte T<sub>h</sub>17-Zellen (adoptiver Transfer) unabhängig von der Fähigkeit des Tieres, IFN $\gamma$  oder IL-12 zu exprimieren, also auch ohne eine Beteiligung der T<sub>h</sub>1-Antwort, EAU auslösen konnten (Luger et al. 2008). Genauso entstand auch durch adoptiven Transfer von Antigen-spezifischen autoreaktiven T<sub>h</sub>1-Zellen in IL-17-defiziente naive Tiere eine EAU (Luger et al. 2008). Die Zellen wurden aus dem Blut von Mäusen gewonnen, die mit IRBP in FCA immunisiert worden waren (Luger et al. 2008). Diese Art der EAU-Induktion löste sowohl eine T<sub>h</sub>1-, als auch eine T<sub>h</sub>17-Antwort aus (Caspi et al. 2008), wodurch beide Effektorzellarten gewonnen werden konnten. Ein inhibitorischer Effekt von IFN $\gamma$  auf T<sub>h</sub>17-Zellen und umgekehrt auch von IL-17 auf T<sub>h</sub>1-Zellen ist wahrscheinlich, da in Versuchen, in denen jeweils eine der beiden T<sub>h</sub>-Antworten ausgeschaltet worden war, das Marker-Zytokin der anderen Population nach EAU-Induktion mit IRBP in FCA signifikant stärker exprimiert war (Luger et al. 2008). Der Knock-Out nur einer der beiden T<sub>h</sub>-Antworten war also nicht in der Lage, die experimentelle Induktion der EAU mittels IRBP in FCA zu verhindern (Luger et al. 2008). In einem zweiten Mausmodell, bei dem die Induktion der EAU unabhängig von FCA durch die Übertragung IRBP-präsentierender dendritischer Zellen in naive Tiere erfolgte, entstand EAU mit dominanter T<sub>h</sub>1-Antwort (Tang et al. 2007). Dies konnte auch von einer anderen Arbeitsgruppe bestätigt werden, da in der

entsprechenden Studie IFN $\gamma$ -Knock-Out-Mäuse nach adoptivem Transfer Antigen-spezifischer dendritischer Zellen im Gegensatz zum Wildtyp keine EAU entwickelten (Luger et al. 2008). Interessanterweise kam es in diesem Modell bei Wildtypmäusen zur vorrangigen Migration von Granulozyten und nicht von Lymphozyten über die BRS (Caspi et al. 2008), was auch in einigen wenigen ERU-Fällen bereits beschrieben werden konnte (Deeg et al. 2001). In einer älteren Studie wurde gezeigt, dass ins Auge übergetretene Lymphozyten vermehrt IFN $\gamma$  und IL-2 exprimierten und IL-4-negativ waren, was für eine Beteiligung der T<sub>h</sub>1- und nicht der T<sub>h</sub>2-Antwort an der Pathogenese der ERU sprach (Gilger et al. 1999). In der Zwischenzeit drängten sich jedoch weitreichende Erweiterungen des von Mosmann 1986 eingeführten Paradigmas der Dichotomie der T-Zellantworten (Mosmann et al. 1986) für viele Spezies, darunter Mensch und Maus, auf (Annunziato et al. 2010, Geginat et al. 2014, Ubel et al. 2014). Die Arbeitsgruppe um Regan stellte vor diesem Hintergrund kürzlich Untersuchungen zur Beteiligung der T<sub>h</sub>17-Antwort an der ERU an (Regan et al. 2012). Durch die Analyse des Zytokinmilieus in anterioren Strukturen betroffener Augen mittels Immunhistochemie konnte bestätigt werden, dass auch an der ERU eine T<sub>h</sub>17-Antwort beteiligt ist (Regan et al. 2012). Die Zytokine IL-6, IL-17 und IL-23 fanden sich vermehrt in uveitischen Augen, während sie in gesunden weitgehend abwesend waren (Regan et al. 2012). IL-6 konnte vor allem in bereits nekrotischen Abschnitten der Uvea detektiert werden, was nach Meinung der Autoren dafür sprach, dass dieses Zytokin eine Funktion bei der Chemotaxis autoreaktiver Lymphozyten ausübt (Regan et al. 2012). Die immunhistochemische Analyse mittels gegen die humanen Interleukine gerichteter Antikörper zeigte eine Ko-Expression von IL-17 und IL-23 in einem Teil der infiltrierten Leukozyten und indizierte so die Ausprägung eines T<sub>h</sub>17-Phänotyps in diesen Zellen (Regan et al. 2012). Weitere Studien zur Bedeutung der T<sub>h</sub>17-Antwort in der ERU liegen bislang nicht vor (PubMed-Recherche Stand 16.3.2015).

## **2.4 Differentielle Proteomanalyse von Leukozyten im Rahmen der ERU**

Das Wissen über Expressionsunterschiede von Proteinen zwischen Leukozyten gesunder und an ERU leidender Individuen ist von grundlegender Bedeutung für die Erforschung der Pathogenese dieser Autoimmunerkrankung. Unsere Arbeitsgruppe konnte im Vorfeld zur vorliegenden Arbeit mittels 2D-DIGE bereits wichtige Erkenntnisse über Unterschiede im Leukozytenproteom von ERU-Patienten und gesunden Pferden sammeln (Degroote et al. 2014, Degroote et al. 2012, Degroote et al. 2013). Nach zweidimensionaler Auftrennung des Proteoms von gesunden und erkrankten Tieren konnten erstmals insgesamt 17 differentiell regulierte Proteine im Gesamt-leukozytenproteom (Degroote et al. 2012) und im Folgeexperiment sechs weitere im Proteom der reinen Lymphozytenpopulationen (Degroote et al. 2014) mittels Massenspektrometrie und differentieller Proteomanalyse identifiziert werden. Eins der Proteine, Laktotransferrin, welches im ersten Experiment differentiell exprimiert war, fand sich auch im zweiten wieder (Degroote et al. 2014, Degroote et al. 2012). Die differentiell regulierten Kandidaten aus beiden Experimenten weisen in anderen Spezies teilweise hochinteressante Funktionen auf, beispielsweise auf den Gebieten Immunantwort, Migration und Leukozytendifferenzierung (Fischer et al. 2006, Gunter et al. 1984, Pao et al. 2007, Shattil et al. 2010), mit denen diese Proteine beim Pferd bisher nicht in Zusammenhang gebracht wurden. Diese Kandidaten bedürfen somit weiterer Beleuchtung.

### **2.4.1 Differentiell regulierte Proteine auf Granulozyten**

Das erste 2D-DIGE-Experiment unserer Arbeitsgruppe zum differentiellen Leukozytenproteom von ERU-Patienten förderte 17 differentiell regulierte Kandidaten zu Tage (Degroote et al. 2012), unter denen einer auf Grund seiner überaus interessanten Funktionen bezüglich Adhäsion, Migration und Überleben von Zellen (Calderwood 2004, Critchley 2000) unser besonderes Interesse weckte. Dieser Kandidat war Talin1, ein großes, zytoplasmatisch gelegenes Dimer, das aus einer Head- und einer Rod-Domäne aufgebaut ist (Critchley 2000). Talin1 spielt als Vermittler zwischen verschiedenen Integrin- $\beta$ -Domänen, wie beispielsweise der  $\beta$ 2-Domäne von LFA-1 in Jurkat-Zellen (Jevnikar et al. 2011), und F-Actin eine wichtige Rolle bei der Zusammensetzung von Actinfilamenten nach Integrinaktivierung an der

Zellmembran (Calderwood and Ginsberg 2003, Shattil et al. 2010). In diesem Sinn ist Talin1 maßgeblich an der Adhäsion und Migration von Leukozyten beteiligt (Degroote et al. 2012).

Nach der Identifizierung von Talin1 als differentiell reguliertem Protein wurde mittels Western Blot und Durchflusszytometrie untersucht, wie stark seine Expression insgesamt in Leukozyten von ERU-Tieren und in einzelnen Subpopulationen dieser von der in gesunden Pferden abweicht (Degroote et al. 2012). Es konnte gezeigt werden, dass Talin1 hochabundant auf allen untersuchten Leukozytenpopulationen gesunder Pferde exprimiert wurde und die Expression lediglich in Granulozyten von ERU-Patienten signifikant abnahm (Degroote et al. 2012). Auf Lymphozyten war Talin1 überraschenderweise nicht differentiell reguliert (Degroote et al. 2012), obwohl es sich bei der ERU um eine primär T-Zell-medierte Erkrankung handelt (Regan et al. 2012). Im Rahmen der therapeutischen Pars plana Vitrektomie von an ERU erkrankten Pferden können ins Auge transmigrierte Leukozyten (vitreale Leukozyten, VL) gewonnen werden, ohne über die Auswirkungen der therapeutischen Operation hinausgehende Beeinträchtigungen des Patienten zu verursachen (Degroote et al. 2013, Werry and Gerhards 1992). In einer weiteren Studie wurden deshalb auch diese Zellen bezüglich ihrer Talin1-Expression analysiert (Degroote et al. 2013). Die intraokuläre Granulozytenpopulation wurde dabei mit peripher zirkulierenden Granulozyten der gleichen, an ERU erkrankten Pferde verglichen (Degroote et al. 2013). Es zeigte sich, dass in VL Talin1 noch einmal signifikant niedriger exprimiert war als in peripheren Zellen der gleichen Tiere (Degroote et al. 2013). Die Expression in VL belief sich auf lediglich 8% der Expression in peripheren Granulozyten des jeweils selben ERU-Tieres, während diese im Vergleich zu Granulozyten gesunder Kontrolltiere bereits auf 44% gesunken war (Degroote et al. 2012, Degroote et al. 2013). Eine verringerte Expression von Talin1 spricht für eine Beeinträchtigung wichtiger Mechanismen der Immunantwort in Talin1-defizienten Granulozyten bei der ERU (Degroote et al. 2012). So können Vorgänge wie beispielsweise die Adhäsion an Endothelien oder die Migration der Zellen durch Störung der Signaltransduktion von der Zelloberfläche ins Zytoplasma möglicherweise nicht mehr physiologisch ablaufen und so zu Veränderungen im Transmigrationsverhalten der entsprechenden Granulozyten führen (Calderwood 2004, Critchley 2009).

Da Talin1 eine so bedeutende Rolle bei der Vermittlung von Signalen der Zelloberfläche an intrazelluläre Strukturen einnimmt, wurde in einer weiteren Studie unserer

Arbeitsgruppe nach Interaktoren dieses interessanten Proteins gesucht (Degroote et al. 2013). Mittels einer Immunpräzipitation (IP) von Talin1 wurden solche Interaktoren aus Leukozyten gesunder Pferde extrahiert und massenspektrometrisch analysiert (Degroote et al. 2013). Dabei konnten erstmalig acht Talin1-Interaktoren auf equinen Leukozyten identifiziert werden, unter denen sich unter anderem Myeloperoxidase (MPO), CD177 und CD90 befanden (Degroote et al. 2013). MPO ist ein granulozytäres Enzym, welches im Zuge der Phagozytose freigesetzt wird und der Produktion reaktiver O<sub>2</sub>-Spezies dient (Al-Abbasi 2015). CD177 war im Mausmodell für die Regulation der Lebensdauer von neutrophilen Granulozyten verantwortlich (Xie et al. 2014). Seine Deletion führte dort zu verringerten Neutrophilenzahlen (Xie et al. 2014), während der Knock-Out seines Inhibitors IκB-Kinase β eine Neutrophilie verursachte (Hsu et al. 2011). Ein weiterer interessanter Interaktor von Talin1 war CD90 (Degroote et al. 2013), ein glykosyliertes Oberflächenprotein, welches Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte unter anderem im Rahmen von Entzündungen vermittelt (Leyton and Hagood 2014, Saalbach et al. 2000, Schubert et al. 2011). Dabei ist es an der Aktivierung, Adhäsion und Transmigration von Neutrophilen und Monozyten des Menschen *in vitro* und der Maus *in vivo* beteiligt (Saalbach et al. 2000, Schubert et al. 2011). Die Interaktion zwischen Talin1 und CD90 im Pferd konnte mittels Rückwärts-Immunpräzipitation von CD90 aus equinen Granulozyten und Detektion von Talin1 im CD90-Eluat bestätigt werden (Degroote et al. 2013). Die Expressionsanalyse von CD90 auf Granulozyten gesunder und kranker Pferde sowie auf vitrealen Granulozyten von ERU-Tieren ergab, dass CD90 auf peripheren Granulozyten an ERU erkrankter Pferde signifikant schwächer exprimiert war als auf denen gesunder Tiere und sich seine Expressionsstärke, analog zu Talin1, auf ins Auge gewanderten Granulozyten abermals reduzierte (Degroote et al. 2013). Die Bedeutung der differentiellen Expression von Talin1 und CD90 sowie die anderer Regulationsmechanismen des angeborenen Immunsystems im Rahmen der ERU ist bisher ungeklärt (Degroote et al. 2013). Bekannt ist aber, dass Granulozyten in einem Modell der experimentellen Autoimmunuveitis in Mäusen, bei der die T<sub>h</sub>17-Antwort vorherrscht, die dominante Leukozytenpopulation in uveitischen Augen bilden (Luger and Caspi 2008) und auch für die humane autoimmune Uveitis als Symptom des Morbus Behçet ist eine granulozytäre Beteiligung beschrieben (Ekinci et al. 2010). Außerdem konnte interessanterweise in einer Studie an 32 Augen von Pferden mit ERU gezeigt werden, dass bei einem Teil der Fälle dieser Erkrankung (4

von 32) ebenfalls vorrangig granulozytäre Infiltrate vorlagen (Deeg et al. 2001). Die funktionelle und klinische Bedeutung dieser Ergebnisse für die Pathogenese der ERU ist bisher aber nicht klar.

#### **2.4.2 Differenziell regulierte Proteine auf Lymphozyten**

CD4<sup>+</sup> Lymphozyten spielen erwiesenermaßen eine Schlüsselrolle bei der Entstehung der experimentellen autoimmunmedierten Uveitis (Diedrichs-Möhring et al. 2014), und autoaggressive T-Helferzellen stellen auch bei der ERU in den meisten Fällen die vorrangig über die BRS ins Auge transmigrierende Zellpopulation dar (Deeg et al. 2001). Deshalb sind Unterschiede im Proteom dieser Zellen in gesunden Pferden und ERU-Patienten von großem Interesse und besitzen möglicherweise grundlegende Bedeutung für die erfolgreiche Suche nach pathogenetisch relevanten Immunmodulationen. In einer weiteren DIGE-basierten Studie unserer Arbeitsgruppe konnten sieben differenziell regulierte Lymphozytenproteine identifiziert werden (Degroote et al. 2014), von denen zuvor nur ein einziges, Laktotransferrin, bereits mit Leukozyten des Pferdes in Verbindung gebracht worden war (Degroote et al. 2012, Kolm et al. 2006). Laktotransferrin, ein Wachstumsfaktor, der die Reifung und Differenzierung von T-Lymphozyten stimuliert (Fischer et al. 2006), war das einzige Protein, das in Lymphozyten der ERU-Tiere stärker exprimiert wurde als in denen der Kontrolltiere (Degroote et al. 2014). In einem früheren Experiment, in welchem das Gesamtleukozytenproteom untersucht wurde, konnte Laktotransferrin ebenfalls von uns identifiziert werden und wies dort die gleiche Regulationsrichtung auf wie im Lymphozytenproteom (Degroote et al. 2012). Die erhöhte Expression von Laktotransferrin weist möglicherweise auf eine verstärkte Aktivierung von T-Zellen hin (Degroote et al. 2014). Ezrin, eins der bei ERU als geringer abundant identifizierten Proteine (Degroote et al. 2014), ist beispielsweise an der Aktivierung von T-Zellen bei der rheumatoiden Arthritis beteiligt (Schulz et al. 2007). Da seine aktive Form phosphoryliert ist (Fievet et al. 2004) und diese möglicherweise nicht detektiert werden konnte, könnte die verringerte Ezrin-Expression auf eine vermehrte Phosphorylierung des Proteins hindeuten. Tyrosine-Protein Phosphatase non-Receptor Type 6 (PTPN6), ein weiteres differenziell exprimiertes Protein bei Lymphozyten von ERU-Patienten (Degroote et al. 2014), wirkt als Dämpfer der Signaltransduktionskaskade in Immunzellen (Pao et al. 2007) und wurde ebenfalls bereits früher mit einer Autoimmunerkrankung, der Psoriasis des Menschen, im Rahmen derer T-Zellen

PTPN6 geringer exprimieren (Eriksen et al. 2010), in Verbindung gebracht. Interessanterweise war auch das spannungsabhängige anionenselektive Kanalprotein (*engl.* Voltage-dependent Anion-selective Channel Protein, VDAC) 2 zwischen Lymphozyten gesunder und an ERU erkrankter Tiere differentiell reguliert (Degroote et al. 2014), welches in der Autoimmunuveitis des Menschen als Autoantigenkandidat identifiziert wurde (Okunuki et al. 2008). Außerdem spielt es eine wichtige Rolle bei der Verhinderung negativer Selektion von murinen Thymozyten durch T-Zell-Rezeptor (*engl.* T-cell Receptor, TCR)-Aktivierung (Ren et al. 2009). Bei verringerter Expression von VDAC2 setzte die Apoptose dieser Zellen verfrüht ein (Ren et al. 2009).

Ein besonders interessanter Kandidat, der aus dem Experiment zum differentiellen Lymphozytenproteom von gesunden Pferden und ERU-Patienten hervorging, ist das zytoskelettale Protein Septin7 (Degroote et al. 2014). Mitglieder der Familie der Septine wurden zuerst in Pilzen, später aber auch in allen anderen Eukaryoten außer Pflanzen nachgewiesen (Kremer et al. 2005). Nach heutigem Kenntnisstand umfasst die Gruppe 14 Mitglieder, die als Proteine des Zytoskeletts stabile Heteromere miteinander ausbilden (Weirich et al. 2008). Septine sind kleine GTPasen, die in motilen T-Zellen zu Filamenten polymerisieren, und korsettähnliche Strukturen innerhalb der Zellmembran bilden, wodurch die Zelle Stabilität erhält (Dolat et al. 2014, Leipe et al. 2002). Für den Prozess der Transmigration zwischen Endothelzellen hindurch bzw. durch transzelluläre Poren hat dieser Vorgang große Bedeutung, da nur bei ausreichender Formstabilität der äußeren Begrenzung der Zelle eine zielgerichtete Bewegung möglich ist (Brown et al. 2001, Tooley et al. 2009). Unter den Septinen spielt Septin7 eine herausragende Rolle, da bei einem Funktionsverlust von Septin7 keine Septin-Polymerisation mehr stattfinden kann, wodurch auch die Funktion aller anderen Septine hochgradig beeinträchtigt wird (Kremer et al. 2005, Tooley et al. 2009). Kremer et al. zeigten dies an HeLa-Zellen, einer humanen Epitheloid-Zelllinie (Kremer et al. 2005), Tooley und Kollegen verwendeten die murine T-Zelllinie D10.G4 (Tooley et al. 2009). T-Zellen, bei denen die Expression von Septin7 durch Anwendung einer short-hairpin (sh) RNA auf etwa 25% der Expression in unbehandelten Zellen verringert war, zeigten langsamere und weniger gerichtete Fortbewegung sowie die zufällig scheinende Ausbildung offenbar funktionsloser Membranausstülpungen (Blebbing), waren aber in der Lage, bis zu fünfmal effizienter durch 3 µm kleine Poren zu transmigrieren als Zellen mit

physiologischer Septin7-Expression (Tooley et al. 2009). Die genauen Mechanismen dieser veränderten Motilität und Transmigrationsfähigkeit und der Einfluss potentieller Interaktoren von Septin7 darauf sind unbekannt, da das Protein bisher vor allem mit Leberkarzinomen (Zhou et al. 2014), tumorösen Erkrankungen des Nervensystems und der Alzheimer-Krankheit (Jia et al. 2010) assoziiert wurde und dabei vorrangig seine Beteiligung an Zellwachstums- und -teilungsmechanismen Gegenstand der Untersuchungen waren (Kelley et al. 2015, Kremer et al. 2007). So sind Septinkomplexe, wie der aus den Septinen 2, 7 und 9, bei der Bildung des Synzytiums während der Zellteilung für die Stabilität interzellulärer Brücken zwischen Mutter- und Tochterzelle verantwortlich und sind in Kooperation mit Myosin II und Mikrotubulinen vor allem in der Interphase entscheidend für die Bildung und Erhaltung der Actin-Stressfasern und der Mitosespindel (Kremer et al. 2005, Kuo et al. 2013). Die Identifikation von Septin7 im DIGE-Experiment unserer Arbeitsgruppe stellte die Erstbeschreibung der Regulierung dieses Proteins im Rahmen einer Autoimmunerkrankung dar (Degroote et al. 2014). Die deutlich verringerte Expression in peripheren Blutleukozyten (PBL) von ERU-Patienten verglichen mit PBL gesunder Tiere, die in dieser Analyse festgestellt wurde, konnte mittels Western Blot verifiziert werden (Degroote et al. 2014). Bei der durchflusszytometrischen Analyse zeigte sich außerdem, dass die Expressionsminderung sich ausschließlich auf T-Zellen vollzog (Degroote et al. 2014). Hier sank die Expression auf 75% bzw. 73% in CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen ab (Degroote et al. 2014). Nach den interessanten Ergebnissen aus der Studie zu Expressionsunterschieden zwischen gesunden PBL und peripheren und intraokulären Leukozyten von ERU-Tieren im Rahmen der Erforschung des Gesamtleukozytenproteoms bei der ERU (Degroote et al. 2012, Degroote et al. 2013) stellt nun auch die Identifikation des funktionell hoch interessanten Septin7 eine wertvolle Grundlage für weitere Studien dar.



## **2.5 Untersuchungen zum differentiellen Oberflächenproteom von Immunzellen bei der ERU**

### **2.5.1 Vorteile proteomischer Studien**

Das Proteom ist, im Gegensatz zum Genom, ständigen Veränderungen unterzogen, die die momentane Funktion und Konstitution einer Zelle widerspiegeln (Doherty and Whitfield 2011). Die Analyse des Proteoms gibt so Einblick in aktuelle Veränderungen des Zellstoffwechsels, welche durch äußere und innere Beeinflussung des Organismus, so zum Beispiel Umweltbedingungen, Alter oder Krankheiten, ausgelöst werden (Doherty and Whitfield 2011) und von Genom- oder Transkriptomanalysen nicht erfasst werden können (Goh et al. 2012). Da das Proteom der meisten Gewebe bzw. Zellarten überaus umfangreich und komplex ist, erzeugt seine massenspektrometrische Analyse Datensätze enormer Größe. Lange Zeit reichte die Kapazität der zur Verfügung stehenden Datenverarbeitungs- und Auswertungssoftware nicht aus, um solche Proben in ihrer Gesamtheit zu untersuchen, da durch zu niedrige Auflösung der Massenspektrometer weitreichende Überlappungen der einzelnen Peptide entstanden (Doherty and Whitfield 2011, Mann and Kelleher 2008). Die 2D-DIGE-Technik wird seit langem, unter anderem auch von unserer Arbeitsgruppe (Zipplies et al. 2009), zur Auftrennung und differentiellen Betrachtung des Proteoms verschiedener Proteingemische angewandt. Auf diese Art ist es möglich, vor der massenspektrometrischen Analyse eine Vorauswahl potentiell interessanter Proteine zu treffen (Mann and Kelleher 2008). Die Gel-basierte Proteomik erfordert jedoch extensive Vorarbeiten, wie das Ausschneiden einer Vielzahl von Gelspots und deren einzelner Verarbeitung für die Analyse im Massenspektrometer (Degroote et al. 2012). Zudem birgt diese Methode Tücken in Bezug auf die Analyse des Gesamtproteoms, da Proteine mit bestimmten Eigenschaften, vor allem Membranproteine, dabei häufig unterrepräsentiert sind, wie auch in einem Experiment unserer Arbeitsgruppe zum Leukozytenproteom des Pferdes auffiel (Degroote et al. 2012). Vor allem sind davon Proteine betroffen, die generell nur eine geringe Abundanz aufweisen, was auf die meisten Membranproteine eukaryotischer Zellen zutrifft (Santoni et al. 2000, Swadzba et al. 2012a). Wichtiger scheint allerdings noch die Tatsache, dass wasserunlösliche Proteine durch ihrer starke Hydrophobie nur schwer in den zur isoelektrischen Fokussierung verwendeten Puffern löslich sind (Santoni et al. 2000). Davon

besonders betroffen sind wiederum Membranproteine mit großen Anteilen integraler Domänen (Santoni et al. 2000). Mit der stetigen Verbesserung der Sensitivität und Auflösung moderner Massenspektrometer und der Entwicklung leistungsfähiger Datenverarbeitungs- und Auswertungssoftware ist es inzwischen allerdings möglich, eine große Zahl von Peptiden in kurzer Zeit zu prozessieren und quantitativ auszuwerten (Doherty and Whitfield 2011), so dass in vielen Fällen auf eine solche 2D-DIGE-gestützte Vorauswahl verzichtet werden kann (Mann and Kelleher 2008). Die Analyse des Proteoms mittels Flüssigkeitschromatographie-gekoppelter Tandemmassenspektrometrie (LC-MS/MS) ermöglicht heute also die Bestimmung und Quantifizierung von Unterschieden in der Zusammensetzung des Proteoms von Proben unterschiedlichen Ursprungs, wie solche kranker Vitreusproben im Vergleich zu denen gesunder Tiere (Hauck et al. 2012). Insbesondere kann auch das Oberflächenproteom von Zellen mit verschiedenen Eigenschaften oder in abweichenden Funktionszuständen, wie das kultivierter und nativer RPE-Zellen, (Szober et al. 2012), miteinander verglichen werden.

## **2.5.2 Die Untersuchung des Oberflächenproteoms**

Obwohl bisher vor allem für intrazelluläre Proteine, wie Talin1 und Septin7, bei Leukozyten von an ERU erkrankten Pferden eine andere Abundanz als in den Zellen gesunder Tiere festgestellt werden konnte (Degroote et al. 2014, Degroote et al. 2012), ist auch der Untersuchung des Oberflächenproteoms von Leukozyten große Bedeutung zuzumessen. Oberflächenproteine, wie beispielsweise Integrine, spielen eine herausragende Rolle bei Zell-Zell-Interaktionen (Espino et al. 2014), die das zentrale Geschehen bei Reaktionen des Immunsystems bilden (Barreiro et al. 2007). Die Untersuchung des Oberflächenproteoms stellt allerdings eine methodische Herausforderung dar, da sich Zellmembranproteine bei der Analyse des Gesamtproteoms häufig durch ihre spezifischen Eigenschaften, wie den oft im alkalischen Bereich liegenden isoelektrischen Punkt und die charakteristische Hydrophobie von Transmembrandomänen, der Identifikation entziehen (Santoni et al. 2000). Im Rahmen der Suche nach Autoantigenen der ERU wurden einige Methoden zur Plasmamembranproteinanreicherung erprobt, die jeweils einen wertvollen Beitrag zur Beleuchtung der komplizierten Pathomechanismen dieser Autoimmunerkrankung leisten konnten (Hauck et al. 2010, Swadzba et al. 2012a, Uhl et al. 2014). Bei der massenspektrometrischen Analyse der Oberflächenproteine von retinalen Zellen

gesunder und an ERU erkrankter Pferde nach Extraktion dieser durch verschiedene Zentrifugationsschritte ergaben sich aus den massenspektrometrisch identifizierten Peptiden 297 Proteine mit mindestens einer Transmembrandomäne, was 57% aller identifizierten Proteine ausmachte (Hauck et al. 2010). Ein Protein, Caveolin-1, welches in den Retinae der ERU-Patienten um den Faktor 16 stärker exprimiert war (Hauck et al. 2010), wurde später als Regulator retinaler Inflammation bestätigt (Li et al. 2014). Caveolin-1 ist unter anderem mit den Pathways „integrin signaling“, „TNF receptor signaling“ und „Focal adhesion“ assoziiert, welche für Autoimmunerkrankungen von großem Interesse sind (Hauck et al. 2010).

In einer weiteren Studie konzentrierten wir uns speziell auf eine Teilfraktion des Plasmamembranproteoms, die N-glykosylierten Membranproteine aus Schweine-retinae (Swadzba et al. 2012a). Dazu wurden Concanavalin A-gekoppelte Sepharose-Beads verwendet, die eine hohe Affinität zu diesen Glykoproteinen aufweisen. Durch eindimensionale Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgелеlektrophorese (1D SDS-PAGE) und Inkubation mit Seren von ERU-Patienten sowie die massenspektrometrische Analyse der entsprechenden Western Blot-Bande konnte ein potentiell Autoantigen, Synaptotagmin-1, identifiziert werden (Swadzba et al. 2012a). Synaptotagmin-1 war zuvor noch nicht mit Uveitis in Verbindung gebracht worden. Interessanterweise zeigte sich, dass Synaptotagmin-1 nicht, wie andere retinale Autoantigene, zum Beispiel CRALBP und IRBP (Deeg et al. 2007a), in Retinae von gesunden Pferden und ERU-Patienten gleichermaßen abundant war, sondern in ERU-Retinae eine deutlich geringere Expression aufwies (Swadzba et al. 2012a), was wir auch in RPE-Zellen von ERU-Tieren zeigen konnten (Uhl et al. 2014). Für die Extraktion von Oberflächenproteinen aus RPE-Zellen *in situ* (Uhl et al. 2014) wurde die von unserer Arbeitsgruppe etablierte Methode der Biotinylierung von Plasmamembranproteinen und anschließender Streptavidin-mediierter Extraktion dieser Proteine aus dem Zelllysate (Szober et al. 2012) auf noch *in situ* befindliche RPE-Zellen angewandt (Uhl et al. 2014). Die Massenspektrometer-gestützte Proteomanalyse der so erzeugten Proteinfractionen ergab eine Plasmamembranproteinanreicherung von 82%, was diese Methode als besonders effizient kennzeichnete (Uhl et al. 2014). Es konnten 27 differentiell regulierte Proteine identifiziert werden, von denen 24 auf RPE-Zellen von ERU-Tieren niedriger abundant waren, unter anderem das oben erwähnte Synaptotagmin-1 (Uhl et al. 2014). Die verringerte Expression von Synaptotagmin-1, sowie zweier weiterer

Kandidaten aus dieser Studie, Basigin und Collectrin, konnte mittels Durchflusszytometrie und Immunhistochemie bestätigt werden (Uhl et al. 2014).

Die Ergebnisse der beschriebenen Studien zeigen deutlich, dass die Untersuchung des Plasmamembranproteoms verschiedener an der ERU beteiligter Zellen einen wertvollen Beitrag zur Aufklärung der Pathogenese dieser Krankheit leisten kann. Das Oberflächenproteom von Lymphozyten, einer Zellpopulation, die eine enorm wichtige Rolle bei der Pathogenese der ERU spielt, wurde bisher nicht untersucht (PubMed-Recherche Stand 16.3.2015). Im Rahmen dieser Arbeit sollte deshalb die differentielle Regulation von Proteinen auf der Oberfläche von peripheren und ins Auge transmigrierten Lymphozyten untersucht werden.

### **2.5.3 Differentielle Regulation des Oberflächenproteoms bei der ERU**

Ins Auge transmigrierte Leukozyten im Rahmen der ERU wurden vielfach Untersuchungen unterzogen, wobei diese Untersuchungen sich bislang auf die Bestimmung der transmigrierten Subpopulationen von Leukozyten beschränkten (Deeg et al. 2001, Gilger et al. 1999, Regan et al. 2012, Romeike et al. 1998). Zwei Analysen unserer Arbeitsgruppe liegen vor und ergaben interessante Proteine, wie beispielsweise Talin1, mit differentieller Proteinexpression zwischen PBL und VL bei ERU-Patienten (Degroote et al. 2014, Degroote et al. 2012). Da diesen Studien jedoch Gel-basierte Experimente zugrunde lagen und diese lediglich ein geringes Identifikationsvermögen für Oberflächenproteine besitzen (Santoni et al. 2000), führten sie neben interessanten zytoplasmatisch gelegenen Kandidaten nur zur Identifikation weniger differentiell exprimierter Oberflächenproteine, wie beispielsweise Laktotransferrin (Degroote et al. 2014, Degroote et al. 2012). Das differentielle Gesamtoberflächenproteom von peripheren und intraokulär transmigrierten Lymphozyten ist bislang jedoch nicht untersucht worden (PubMed-Recherche 10.3.2015). Es stellt allerdings einen wichtigen Ansatzpunkt für die Erforschung der ERU dar.

Für die humane autoimmune Uveitis und ihr Modell, die EAU, liegen bisher ebenfalls keine umfassenden oberflächenproteomischen Daten vor (PubMed-Recherche Stand 16.3.2015). Es konnte lediglich gezeigt werden, dass das Adhäsionsmolekül ICAM-1 in intraokulären CD4<sup>+</sup> Lymphozyten von Patienten mit aktiver Uveitis im Vergleich zu PBL dieser Patienten stärker exprimiert wird (Martin et al. 2002). Eine Bedeutung

solcher differentiell regulierter Proteine für den Krankheitsverlauf und die Pathogenese wurde bisher nicht untersucht (PubMed-Recherche Stand 16.3.2015).

Die Beschreibung des differentiellen Oberflächenproteoms von peripheren und intraokulären Lymphozyten bei der ERU ist Grundlage für die Aufklärung der Pathomechanismen, die diese Proteine steuern könnten, und soll in dieser Arbeit erfolgen.

## 3 MATERIAL UND METHODEN

### 3.1 Probenmaterial

Für die im Zuge dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden Proben von insgesamt 35 Pferden gewonnen. Es handelte sich dabei um elf augengesunde Kontrollpferde, von denen zehn für die Blutprobenentnahme und eines als Lymphknotenspender herangezogen wurden. Die restlichen 24 Pferde hatten mindestens zwei Uveitis-Schübe mit klassischen Symptomen der ERU, wie Blepharospasmus, vermehrte Lakrimation und Photophobie (Gilger and Michau 2004), erlitten und hatten von einem Kliniker die Diagnose ERU erhalten (ERU-Pferde). Von diesen wurden ebenfalls Blutproben genommen. Insgesamt konnten für diese Arbeit also periphere Blutleukozyten (PBL) aus Vollblut von 34 Pferden verwendet werden. Die Blutprobenentnahme von Pferden wurde bei der Regierung von Oberbayern unter der Genehmigungsnummer 55.2-1-54-2532.3-22-12 angezeigt. Zusätzlich konnten von 15 der 24 ERU-Pferde durch therapeutische Vitrektomie vitreale Leukozyten (VL) gewonnen werden, die uns von der Klinik für Pferde der LMU München unter Vorstand von Prof. Dr. Hartmut Gerhards zur Verfügung gestellt wurden. Blutproben gesunder Pferde wurden uns unter anderem von der Abteilung Innere Medizin und Gynäkologie der Klinik für Pferde unter Leitung von Prof. Dr. Lutz Göhring zur Verfügung gestellt.

Blutleukozyten und vitreale Zellen der Pferde wurden in verschiedenen Experimenten eingesetzt. In den einzelnen Experimenten wurden insgesamt folgende Tierzahlen und Proben untersucht:

Versuche zur Beurteilung der Bindungseigenschaften der anti-Septin7-Antikörper-Klone:

- Western Blots: PBL von vier Kontrollpferden
- Durchflusszytometrie: Blutlymphozyten von sechs Kontrollpferden
- Immunzytochemie: PBL eines Kontrollpferdes
- Immunpräzipitation: PBL eines Kontrollpferdes

Versuche zur Bestimmung der Septin7-Expression auf Blutlymphozyten und VL:

- Durchflusszytometrie (Gesamtexpression):
  - o Blutlymphozyten von fünf Kontrollpferden

- Blutlimphozyten und VL von fünf ERU-Pferden
- Durchflusszytometrie (Subpopulationen):
  - Blutlimphozyten von einem Kontrollpferd
  - Blutlimphozyten und VL von einem ERU-Pferd
- Immunzytochemie: Blutlimphozyten und VL von einem ERU-Pferd

Transmigrationsassay und Western Blot zur Bestimmung des Septin7-Silencing-Effekts:

- PBL von vier Kontrollpferden

Immunpräzipitation von Septin7, Vimentin und Laktotransferrin

- PBL eines Kontrollpferdes

Durchflusszytometrie zur Bestimmung der Regulation von Vimentin

- Blutlimphozyten und VL eines ERU-Pferdes

Durchflusszytometrie zur Bestimmung der Regulation von Laktotransferrin

- Blutlimphozyten von zehn Kontrollpferden
- Blutlimphozyten von 23 ERU-Pferden
- VL von elf der Blutlimphozytenspender-ERU-Pferde

Massenspektrometrische Untersuchung der differentiellen Proteome von Blutlimphozyten und VL in ERU:

- Blutlimphozyten und VL eines ERU-Pferdes

Durchflusszytometrie zur Bestimmung der Regulation von Cluster of Differentiation (CD) 150 und CD166:

- Blutlimphozyten und VL von 14 ERU-Pferden

Transmigrationsassay zur Bestimmung des Effekts der Blockade von CD166:

- PBL eines Kontrollpferdes

Für die Immunhistochemie zur Beurteilung der Bindungseigenschaften der Antikörper-Klone wurden außerdem Mandibularlymphknoten eines gesunden Schlachtpferdes herangezogen (Ausnahmegenehmigung für die Verwendung tierischer Nebenprodukte zu Lehr- und Forschungszwecken ausgestellt am 22.08.2013 durch den Abfallwirtschaftsbetrieb München, Registriernummer DE 09 162 0008 -21).

### 3.1.1 Puffer und Lösungen zur Gewinnung und Aufbereitung von PBL und VL

#### Trennlösung zur Isolierung von PBL mittels Dichtegradientenzentrifugation

Pancoll Trennlösung<sup>1</sup> (Dichte 1,077 g/ml), gebrauchsfertig

#### Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), pH 7,2

NaCl <sup>2</sup> (137 mM) <sup>3</sup>	8,00 g
KCl (2,6 mM)	0,20 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1,4 mM)	0,20 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O (8,1 mM)	1,45 g
in 1000 ml Aqua dest. lösen.	
pH-Wert auf 7,2 einstellen.	

#### Einfriermedium

DMSO (10%)	1,00 ml
FCS <sup>1</sup> (90%)	9,00 ml
bei -20°C lagern.	

#### Lysepuffer Western Blot (WB)

Harnstoff <sup>4</sup> (9 M)	27,00 g
Thioharnstoff <sup>5</sup> (2 M)	7,60 g
CHAPS <sup>5</sup> (4%)	2,00 g
DTT <sup>6</sup> (65 mM)	0,50 g

in 50 ml Aqua bidest. lösen.

Alle Zutaten bei Raumtemperatur (RT) mindestens fünf Stunden rühren, bis alles gelöst ist.

Aliquots von je 1 ml bei -20°C lagern.

Direkt vor Gebrauch 100 µl Aqua bidest. pro 1 ml Lysepuffer zusetzen.

---

<sup>1</sup> Pan Biotech, Aidenbach

<sup>2</sup> Alle nicht extra bezeichneten Reagenzien: Applichem, Darmstadt

<sup>3</sup> Werte in Klammer: Endkonzentration in der Lösung

<sup>4</sup> GE Healthcare, Freiburg

<sup>5</sup> Sigma-Aldrich, Taufkirchen

<sup>6</sup> Serva, Heidelberg



### **Tris-gepufferte Kochsalzlösung (TBS), pH 7,3**

Tris (50 mM) 1,21 g

NaCl (150 mM) 8,76 g

in 1000 ml Aqua bidest. lösen.

pH auf 7,3 einstellen.

### **Lysepuffer Immunpräzipitation (IP)1 (CHAPS-Lysepuffer)**

3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-

propanesulfonate (CHAPS)<sup>7</sup> (2%) 200,00 mg

in 10 ml TBS lösen.

Kurz vor Gebrauch mit 200 µl Proteaseinhibitor (50 x Complete, EDTA-frei<sup>8</sup>) versetzen.

### **Lysepuffer IP2 (DM-Lysepuffer)**

Dodecyl β-D-maltosid<sup>7</sup> (DM) (1%) 100,00 mg

in 10 ml TBS lösen.

Kurz vor Gebrauch mit 200 µl Proteaseinhibitor (50 x Complete, EDTA-frei<sup>8</sup>) versetzen.

### **Lysepuffer IP3 (Alternative Radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer)**

SDS 10% (0,1%) 100,00 µl

Sodium Deoxycholat<sup>7</sup> (0,5%) 50,00 mg

Nonidet P-40<sup>8</sup> (0,1%) 10,00 µl

ad 10 ml TBS.

Kurz vor Gebrauch mit 200 µl Proteaseinhibitor (50 x Complete, EDTA-frei<sup>8</sup>) versetzen.

---

<sup>7</sup> Sigma-Aldrich, Taufkirchen

<sup>8</sup> Roche, Unterhaching

### **3.1.2 Gewinnung der Blutproben**

Nach Desinfektion der Injektionsstelle wurde den Pferden eine dem Bedarf entsprechende Menge Blut (10 – 200 ml) aus der Vena jugularis entnommen und zu je 10 ml in Lithium-Heparin Röhrchen<sup>9</sup> abgefüllt.

### **3.1.3 Gewinnung der PBL mittels Dichtegradientenzentrifugation**

Die Lithium-Heparin-Röhrchen<sup>9</sup> mit den frisch gewonnenen Blutproben wurden für circa 10 Minuten bei RT aufrecht gestellt, bis sich die Erythrozyten deutlich abgesetzt hatten. Mit einer Pipette wurde das überstehende Plasma-PBL-Gemisch vorsichtig und ohne erneutes Aufwirbeln der absedimentierten Erythrozyten abgenommen und in einem 15 ml Röhrchen<sup>10</sup> auf 3 ml Pancoll Trennlösung<sup>11</sup> geschichtet. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation bei 23°C für 25 Minuten (290 rcf, Bremse ausgeschaltet). Die dadurch zwischen Plasma und Pancoll entstandene, lymphozytenreiche Interphase, welche nur noch wenige Granulozyten enthielt, wurde unter möglichst geringer Aspiration der benachbarten Phasen abgenommen und in 10 ml kaltes PBS überführt. Es folgten zwei Waschschrte mit kaltem PBS (415 rcf, 10 min, 4°C), bevor die Zahl der gewonnenen PBL ermittelt und die Zellen anschließend direkt weiterverwendet oder zur Aufbewahrung bearbeitet wurden.

### **3.1.4 Gewinnung von Glaskörperspülproben**

Im Rahmen von zu therapeutischen Zwecken durchgeführten Vitrektomien an ERU-Patienten in der Klinik für Pferde der LMU München wurde der Glaskörper des jeweils betroffenen Auges zerkleinert, ausgespült und durch physiologische Kochsalzlösung ersetzt (Werry and Gerhards 1992). Der abgesaugte, verdünnte Glaskörper wurde uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Hartmut Gerhards zur Verfügung gestellt.

---

<sup>9</sup> Kabe Labortechnik, Nümbrecht-Elsenroth

<sup>10</sup> Sarstedt, Nümbrecht

<sup>11</sup> Pan Biotech, Aidenbach

### 3.1.5 Gewinnung von VL aus den Glaskörperspülproben

Zur Entfernung grober Gewebereste wurde die Spülprobe direkt im Anschluss an die Vitrektomie durch ein feinmaschiges Sieb filtriert. Die geklärte Flüssigkeit wurde anschließend gleichmäßig auf 50 ml Röhrchen<sup>12</sup> aufgeteilt und für 10 Minuten bei 415 rcf zentrifugiert (4°C). Das entstandene Pellet wurde zweimal mit kaltem PBS gewaschen (415 rcf, 10 min, 4°C), erneut resuspendiert und die Zellzahl der gewonnenen VL bestimmt.

### 3.1.6 Zählung und Differenzierung der gewonnenen Zellen

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl der Zellsuspension aus Kap. 3.1.3 oder 3.1.5 mit 10 µl Trypanblau<sup>13</sup> vermischt (Verdünnung 1:2). 10 µl der so entstandenen Mischung wurden in eine Neubauer-improved Zählkammer<sup>14</sup> (Kammertiefe 0,1 mm) gegeben und manuell ausgezählt. Waren in fünf diagonal angeordneten Gruppenquadraten mehr als 100 Zellen vorhanden, wurden diese ausgezählt und zur Berechnung der Gesamtzellzahl herangezogen. Waren es weniger als 100 Zellen, wurden alle 25 Gruppenquadrate ausgezählt (Fläche pro Gruppenquadrat 0,04 mm<sup>2</sup>).

Zur Berechnung der Zellzahl diene folgende Formel:

$$\text{Zellen pro } \mu\text{l Suspension} = \frac{\text{gezählte Zellzahl}}{\text{ausgezählte Fläche [mm}^2\text{]} \cdot \text{Kammertiefe [mm]} \cdot \text{Verdünnung}}$$

Die mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnenen PBL zur Analyse des Lymphozytenoberflächenproteoms sowie die hierzu bestimmten VL des gleichen Tieres wurden mittels der Färbung nach Pappenheim differenziert. Dazu wurden je  $1 \times 10^5$  Zellen in 200 µl PBS mittels Zentrifugation (170 rcf, 5 min) in der Zytospinzentrifuge<sup>15</sup> unter Verwendung von Kaminaufsätzen auf einen Objektträger<sup>16</sup> übertragen. Anschließend wurden die Zellen nach 30 Minuten Lufttrocknung nach der Färbemethode nach Pappenheim angefärbt und bei 100-facher Vergrößerung mäanderförmig ausgezählt.

---

<sup>12</sup> Sarstedt, Nürnberg

<sup>13</sup> Sigma-Aldrich, Taufkirchen

<sup>14</sup> NeoLab, Heidelberg

<sup>15</sup> Hettich, Tuttlingen

<sup>16</sup> Medite, Burgdorf

### **3.1.7 Aufbewahrung von lebenden PBL und VL**

Zur späteren Verwendung lebender Zellen wurde die Zellsuspension aus Kap. 3.1.3 oder 3.1.5 nach der Zellzählung (Kap. 3.1.6) bei 415 rcf abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das entstandene Pellet wurde in 1,5 ml Einfriermedium pro  $2 \times 10^7$  Zellen resuspendiert, zu je 1,5 ml in Einfrierröhrchen<sup>17</sup> aliquotiert und schonend auf -80°C herunter gekühlt. Das Auftauen der Zellen erfolgte direkt vor deren Verwendung durch vorsichtiges Resuspendieren und dadurch Auftauen der gefrorenen Zellsuspension in eiskaltem PBS mit zwei anschließenden Waschschritten (415 rcf, 10 min, 4°C) zur Entfernung des DMSO.

### **3.1.8 Aufbereitung und Aufbewahrung von PBL für Western Blot**

Die Zellsuspension wurde nach der Bestimmung der Zellzahl bei 415 rcf abzentrifugiert (10 min, 4°C) und der Überstand der Leukozytenpellets verworfen. Je nach Größe wurden die Pellets durch Zugabe von 100 - 1000 µl Lysepuffer WB gelöst. Anschließend wurde der Proteingehalt der Proben bestimmt und die Lysate bei -20°C aufbewahrt.

### **3.1.9 Aufbereitung von PBL für die Immunpräzipitation**

Analog zur Lyse der PBL für Western Blots wurden auch die PBL für die Immunpräzipitation (IP) bei 415 rcf zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zur Lyse wurde das Pellet in 300 - 400 µl des entsprechenden Puffers (Lysepuffer IP1, IP2 oder IP3; siehe Kap. 3.9.1) pro  $1 \times 10^7$  Zellen resuspendiert und bei Raumtemperatur 5 – 10 Minuten lang gut gevortext bis das Lysat flüssig war. Anschließend wurde der Proteingehalt der Proben bestimmt und die Lysate frisch verwendet.

---

<sup>17</sup> Sarstedt, Nürnberg

## 3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration der PBL-Lysate

### 3.2.1 Puffer und Lösungen zur Proteinbestimmung

#### Bradford-Reagenz

5 x Bradford Reagenz <sup>18</sup>	1,00 ml
Aqua bidest.	4,00 ml

#### Bovines Serum Albumin (BSA)-Stammlösung (4 mg/ml)

BSA	40,00 mg
in 10 ml Aqua dest. lösen.	
Zu je 1 ml aliquotieren und bei -20°C lagern.	

#### Lysepuffer WB

Lysepuffer WB (siehe Kap. 3.1.1).

#### HCl

Salzsäure 1 M, gebrauchsfertig.

### 3.2.2 Durchführung der Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration der PBL-Lysate für Western Blots und Immunpräzipitationen, sowie der Immunpräzipitate aus Kap. 3.9.2.1 und 3.9.2.3 wurde nach der von Bradford beschriebenen Methode (Bradford 1976) durchgeführt. Die in den Proben enthaltenen Proteine bilden dabei mit dem Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau G-250 einen Komplex, wodurch das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 470 nm auf 595 nm verschoben wird. Die Proteinmenge der Proben lässt sich anhand der hierzu proportionalen Absorption bestimmen.

Es wurde eine Standardkurve mit BSA erstellt. Dazu wurden Standards mit BSA-Konzentrationen von 0 (Leerwert), 0,125, 0,25, 0,5, 1 und 2 mg/ml im jeweils verwendeten Lysepuffer hergestellt. Zur Proteinbestimmung wurden die Zelllysate in entsprechendem Lysepuffer soweit verdünnt, dass ihre Proteinkonzentrationen innerhalb des linearen Bereichs der Standardkurve lagen. Für Proben, die mit dem Lysepuffer WB lysiert worden waren, wurde außerdem sowohl den Standards als

---

<sup>18</sup> Serva, Heidelberg

auch dem Lysepuffer zur Probenverdünnung HCL zugesetzt (50 µl pro 1 ml Lysepuffer). Je 5 µl jedes Standards sowie jeder Probe wurden in je zwei Dellen einer 96-Loch-Flachbodenmikrotiterplatte<sup>19</sup> pipettiert. Nach Zugabe von je 250 µl Bradford-Reagenz, folgte eine 10-minütige Inkubation bei RT. Die Extinktionen wurden bei einer Wellenlänge von 595 nm in einem ELISA-Reader (Sunrise)<sup>20</sup> photometrisch bestimmt. Die Nettoabsorption jeder Probe und jedes Standards wurde aus dem Mittelwert der Doppelbestimmung und durch Abzug des Mittelwerts der Leerwerte berechnet. Anhand der aus den Werten der Standards erstellten Standardkurve ließ sich anschließend die Proteinkonzentration bestimmen und entsprechend der verwendeten Verdünnung die Proteinmenge in den Proben berechnen.

### 3.3 Herstellung monoklonaler Antikörper

#### 3.3.1 Puffer und Lösungen für die Herstellung monoklonaler Antikörper

##### Immunisierungsvehikel

PBS (Kap. 3.1.1)	150,00 µl
Inkomplettes Freund'sches Adjuvans <sup>21</sup>	150,00 µl
CpG 2006 500 µM <sup>22</sup> (5 nmol)	10,00 µl

##### Booster-Vehikel

PBS (Kap. 3.1.1)	150,00 µl
CpG 2006 500 µM <sup>22</sup> (5 nmol)	10,00 µl

##### DMSO

DMSO, gebrauchsfertig.

##### Polyethylenglycol

Polyethylenglycol, gebrauchsfertig.

---

<sup>19</sup> Sarstedt, Nürnberg

<sup>20</sup> Tecan, Crailsheim

<sup>21</sup> Sigma-Aldrich, Taufkirchen

<sup>22</sup> TIB MOLBIOL, Berlin

**HAT-Medium**

HAT Media Supplement (50 x)<sup>23</sup> 10,00 ml  
ad 500 ml DMEM<sup>24</sup>.

**3.3.2 Immunisierung von Ratten und Mäusen mit Peptiden von Septin7**

Die Herstellung der monoklonalen anti-Septin7-Antikörper erfolgte durch Frau Dr. Elisabeth Kremmer, Institut für molekulare Immunologie, Helmholtz Zentrum München. Der erste Schritt zur Erzeugung dieser Antikörper war die Immunisierung von Ratten (LOU/C) und Mäusen (C57BL/6) mit einem von zwei rekombinanten Peptiden<sup>25</sup> des equinen Septin7-Proteins (Ensembl-Transcript-ID: ENSECAT00000024587). Zum einen handelte es sich dabei um ein Peptid mit der Sequenz GVDNNKNKGQLTK (AS 299 – 311; „Septin7-2“), zum anderen um den C-Terminus des Proteins (AS 397 - 415; Sequenz: EQQNSSRTLEKNKKKGKIF; „Septin7-1“). Jeweils 30 µg der Peptide wurden mit 300 µl des Immunisierungsvehikels versetzt und den Ratten und Mäusen subkutan (s.c.) und intraperitoneal (i.p.) injiziert. Sechs Wochen nach der Immunisierung erfolgte eine Booster-Injektion, bei der erneut 30 µg des jeweiligen Peptids, gelöst in 150 µl Boostervehikel, s.c. und i.p. verabreicht wurden.

**3.3.3 Zellfusionierung und Gewinnung der instabilen Antikörper-Klone**

Drei Tage nach der Booster-Injektion wurden die immunisierten Tiere getötet und die in ihren Milzen enthaltenen B-Lymphozyten durch Dichtegradientenzentrifugation des Milzhomogenisats isoliert. Diese Zellen wurden anschließend einer Fusion mit Zellen der Myelomzelllinie P3X63-Ag8.653 nach dem von Kremer und Marquez beschriebenen Standardverfahren (Kremer and Marquez 2004) unterzogen. Dafür wurden B-Zellen und Myelomzellen im Verhältnis 5:1 in HAT-Medium unter Zusatz von 10% DMSO und 50% Polyethylenglycol bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 7 Tage kokultiviert, wodurch diese zu sogenannten Hybridomzellen fusionierten. Die Hybridomzellen wurden anschließend abzentrifugiert (415 rcf, 10 min, RT), zweimal mit 37°C warmem PBS gewaschen und einzeln in Dellen von 96-Loch-Platten<sup>26</sup> ausgesät.

---

<sup>23</sup> Sigma-Aldrich, Taufkirchen

<sup>24</sup> Pan Biotech, Aidenbach

<sup>25</sup> Peps 4 LS, Heidelberg

<sup>26</sup> Sarstedt, Nümbrecht

Dazu wurden die Hybridomzellen so stark in HAT-Medium verdünnt, dass sich rechnerisch 10 Zellen in einem Milliliter Medium befanden, und davon 100 µl pro Delle eingesetzt (entspricht durchschnittlich einer Zelle pro Delle). Die weitere Kultivierung erfolgte bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Sobald eine Proliferation der Hybridomzellen zu erkennen war (Hybridombildung), wurden die Überstände der einzelnen Dellen mit den darin enthaltenen Antikörpern mittels Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) auf ihre Bindungsaffinität an das jeweilige Immunisierungspeptid von Septin7 getestet. Die zwölf in diesem ELISA positiv getesteten Überstände wurden in weiteren Methoden auf ihre Eignung zur Detektion von equinem Septin7 untersucht (Kap. 4.1.1).

### **3.3.4 Stabilisierung der Antikörper-Klone durch Reklonierung**

Die sieben Hybridome, deren Zellkulturüberstände bei der Überprüfung des Reaktionsmusters mittels Western Blot und Durchflusszytometrie eine Bindung an equines Septin7 gezeigt hatten (Kap. 4.1.2), wurden zur Stabilisierung ausgewählt. Im Labor von Frau Dr. Elisabeth Kremmer wurden diese Zellen wie oben beschrieben erneut einzeln in HAT-Medium kultiviert und deren Überstände nach ausreichender Proliferation der Zellen einem ELISA-Screening bezüglich ihrer Bindung an Septin7 unterzogen. Negative Zellen wurden verworfen, die positiven erneut einzeln ausgesät. Dieser Vorgang, die Reklonierung, wurde so lange wiederholt, bis das ELISA-Screening schließlich keine negativen Klone mehr zeigte; bis also alle Zellen, die in einer Delle gewachsen waren, identische anti-Septin7-Antikörper produzierten und somit eine Monoklonalität der Antikörper erreicht war.



## **3.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

### **3.4.1 Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE**

#### **Acrylamid-Lösung**

Acrylamide-Bis Lösung 33%<sup>27</sup>, gebrauchsfertig.

#### **Bromphenolblau-Lösung**

Eine Spatelspitze Bromphenolblau-Pulver<sup>28</sup> in 10 ml Aqua bidest. lösen.

#### **Ammoniumpersulfat (APS)-Lösung 10%**

APS 1,00 g

in 10 ml Aqua bidest. lösen.

Aliquotiert bei -20° lagern und unmittelbar vor Verwendung auftauen.

#### **TEMED-Lösung**

N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED), gebrauchsfertig.

#### **10% Natriumdodecylsulfat (SDS)-Lösung**

SDS 10,00 g

in 100 ml Aqua bidest. lösen.

Lösung bei Raumtemperatur lagern.

#### **20% Natriumdodecylsulfat (SDS)-Lösung**

SDS 20,00 g

in 100 ml Aqua bidest. lösen.

Lösung bei Raumtemperatur lagern

#### **Gelpuffer, pH 8,8**

Tris (1,5 M) 18,15 g

in 100 ml Aqua bidest. lösen.

pH auf 8,8 einstellen.

---

<sup>27</sup> Serva, Heidelberg

<sup>28</sup> Sigma-Aldrich, Taufkirchen

**Sammelgelpuffer, pH 6,8**

Tris (500 mM) 6,00 g

in 100 ml Aqua bidest. lösen.

pH auf 6,8 einstellen.

**5 x Elektrophoresepuffer-Stammlösung, pH 8,3**

Tris (120 mM) 15,00 g

Glycin<sup>29</sup> (960 mM) 72,00 g

SDS (0,5%) 5,00 g

in 1000 ml Aqua dest. lösen.

pH auf 8,3 einstellen.

Für die Elektrophorese 1:5 mit Aqua dest. verdünnen.

**1,5 M Tris, pH 6,8**

Tris<sup>30</sup> (1,5 M) 1,82 g

in 10 ml Aqua bidest. lösen.

pH auf 6,8 einstellen.

**5 x Lämmli-puffer (reduzierend)**

1,5 M Tris-HCl, pH 6,8 (250 mM) 8,33 ml

20% SDS-Lösung (5%) 12,50 ml

Glycerin, wasserfrei (50%) 25,00 ml

500 mM 2-Mercaptoethanol<sup>31</sup> (17,5 mM) 1,75 ml

ad 50 ml Aqua bidest.

Eine Spatelspitze Bromphenolblau<sup>31</sup>-Pulver hinzufügen.

Lösung aliquotieren und bei -20°C lagern.

---

<sup>29</sup> Biomol, Hamburg

<sup>30</sup> Serva, Heidelberg

<sup>31</sup> Sigma-Aldrich, Taufkirchen

### **Abdichtgel**

Aqua bidest.	400,00 µl
33% Acrylamid-Lösung <sup>32</sup> (10%)	200,00 µl
10% APS-Lösung (0,3%)	20,00 µl
TEMED-Lösung (0,3%)	2,00 µl

APS- und TEMED-Lösung erst unmittelbar vor dem Gießen der Gele zugeben.

### **Laufgel (10% SDS Gel)**

Aqua bidest.	4,20 ml
Gelpuffer, pH 8,8 (25%)	2,50 ml
33% Acrylamid-Lösung <sup>32</sup> (1%)	3,30 ml
10% SDS-Lösung (0,1%)	100,00 µl
10% APS-Lösung (0,05%)	50,00 µl
TEMED-Lösung (0,2%)	20,00 µl

APS- und TEMED-Lösung erst unmittelbar vor dem Gießen der Gele zugeben.

### **Sammelgel (4% SDS Gel)**

Aqua bidest.	6,17 ml
Sammelgelpuffer, pH 6,8 (25%)	2,50 ml
33% Acrylamid-Lösung <sup>32</sup> (4%)	1,33 ml
10% SDS-Lösung (0,1%)	100,00 µl
Bromphenolblau-Lösung	100,00 µl
10% APS-Lösung (0,09%)	90,00 µl
TEMED-Lösung (0,3%)	30,00 µl

APS- und TEMED-Lösung erst unmittelbar vor dem Gießen der Gele zugeben.

### **Isopropanol**

99,8% 2-Propanol (Isopropanol).

---

<sup>32</sup> Serva, Heidelberg

### 3.4.2 Durchführung der 1D Gelelektrophorese

Nach der von Laemmli beschriebenen Methode erfolgte die eindimensionale Auftrennung der Proteine aus equinen Leukozytenlysaten (Kap. 3.1.9) und Immunpräzipitaten (Kap. 3.9.2.1 und 3.9.2.3) nach ihrem Molekulargewicht durch Anlegen einer elektrischen Spannung in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Laemmli 1970). Dabei laufen Proteine in einem elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe abhängig von der Dichte des Gels unterschiedlich weit in ein SDS-Gel ein, wobei die größeren Proteine wie in einem Sieb schon weiter oben im Gel abgefangen werden und kleinere Proteine weiter nach unten gelangen können. Die verwendeten Gele wurden in einer Mini Protean Tetra System Gießkammer<sup>33</sup> in einer Größe von 8,5 x 6 cm und einer Dicke von 1 mm gegossen. Um ein Auslaufen der Gele zu verhindern, wurden in die Kammern zuerst je 300 µl schnell härtende Abdichtgele gegossen. Darauf wurde dann das Laufgel bis zu einer Höhe von 6 cm eingefüllt und sofort mit Isopropanol überschichtet. Nach Auspolymerisierung des Laufgels wurde das Isopropanol abgenommen und das Sammelgel darauf geschichtet. In das noch flüssige Sammelgel wurde ein entsprechender Kamm zur Herstellung von Probenfächerchen eingelegt, um mehrere Proben in einem Gel gleichzeitig auftrennen zu können. Die aufzutrennenden Proben wurden im Verhältnis 1 µl 5 x Lämmli-Puffer pro 2,5 µg Protein mit reduzierendem Lämmli-Puffer verdünnt und im Thermomixer (750 rpm) 5 Minuten bei 95°C erhitzt. Um später das Molekulargewicht der aufgetrennten Proteine ablesen zu können, wurden in eine der vorgeformten Geltaschen nach Auspolymerisierung des Sammelgels 3 µl Serva Triple Color Protein Ladder<sup>34</sup> eingefüllt. Die restlichen Geltaschen wurden jeweils mit den aufzutrennenden Proben bestückt. Nach dem Überführen der Gele in die Elektrophoresekammern<sup>34</sup> und Befüllen dieser mit Elektrophoresepuffer wurden die Kammern an das Power Pac Basic Power Supply<sup>34</sup> angeschlossen. Die Proben liefen bei RT mit 12,5 mA pro Gel in das Sammelgel ein, bis die Lauffront das Laufgel erreicht hatte. Dann wurde die Amperezahl auf 25 mA pro Gel erhöht. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald die Lauffront am unteren Gelrand angekommen war.

---

<sup>33</sup> Serva, Heidelberg

<sup>34</sup> Bio-Rad, München

### 3.5 Western Blot

#### 3.5.1 Puffer und Lösungen für den Western Blot

##### **Anodenpuffer I 300 mM, pH 10,4**

Tris (300 mM)	36,33 g
99,8% Methanol (20%)	200,00 ml
ad 1000 ml Aqua bidest.	
pH auf 10,4 einstellen.	

##### **Anodenpuffer II 25 mM, pH 10,4**

Tris (25 mM)	3,03 g
99,8% Methanol (20%)	200,00 ml
ad 1000 ml Aqua bidest.	
pH auf 10,4 einstellen.	

##### **Kathodenpuffer, pH 9,4**

Tris (25 mM)	3,03 g
$\epsilon$ -Aminocaprönsäure (38 mM)	5,25 g
99,8% Methanol (20%)	200,00 ml
ad 1000 ml Aqua bidest.	
pH auf 9,4 einstellen.	

##### **Ponceau S-Färbelösung**

Ponceau-S <sup>35</sup> (0,2%)	0,20 g
Trichloressigsäure <sup>35</sup> (3%)	3,00 g
in 100 ml Aqua bidest. lösen.	

##### **PBS-Tween Lösung (PBS-T)**

Tween-20 (0,05%)	0,50 ml
ad 1000 ml PBS (Kap. 3.1.1).	

---

<sup>35</sup> Sigma-Aldrich, Taufkirchen

### 1% Polyvinylpyrrolidone-Tween Lösung (PVP-T)

Polyvinylpyrrolidone (PVP40)<sup>36</sup> 1,00 g  
in 100 ml PBS-T lösen.

### ECL (Enhanced-Chemilumineszenz)-Lösung A

Tris (100 mM) 2,42 g  
Luminol<sup>36</sup> (1,4 mM) 50,00 mg  
in 200 ml Aqua bidest. lösen.  
pH auf 8,6 einstellen.  
Lösung bei 4°C max. 7 Tage lagern.

### ECL-Lösung B

Para-Hydroxycoumarinsäure<sup>36</sup> (6,7 mM) 0,11 g  
in 100 ml DMSO lösen.  
Lösung dunkel und bei RT max. 14 Tage lagern.

### H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>37</sup>, gebrauchsfertig.

### ECL (Enhanced-Chemiluminescence)

Unmittelbar vor Gebrauch wurden die Lösungen in folgendem Verhältnis gemischt:

ECL-Lösung A	1,00 ml
ECL-Lösung B	0,10 ml
30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3,00 µl

---

<sup>36</sup> Sigma-Aldrich, Taufkirchen

<sup>37</sup> Merck Millipore, Darmstadt

### 3.5.2 Durchführung des Western Blots

Nach der Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine mit einem diskontinuierlichen Puffersystem in einem Blue Flash-L Semi-dry-Elektroblotter<sup>38</sup> vom Gel auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran<sup>39</sup> überführt. Die Blot-Papiere<sup>40</sup> und die PVDF-Membran wurden auf die Größe des Gels zugeschnitten und wie folgt übereinander geschichtet: auf die anodische Platte des Elektroblotters wurden zwei in Anodenpuffer I getränkte Blot-Papiere und ein in Anodenpuffer II getränktes Blot-Papier gelegt. Dann wurde die zuvor in Methanol aktivierte und in Aqua bidest. gewaschene PVDF-Membran und anschließend das SDS-Gel aufgelegt. Zum Abschluss wurden drei in Kathodenpuffer getränkte Blot-Papiere auf dem Gel platziert. Mit einer Glaspipette wurden sämtliche, den Stromfluss störende Luftblasen ausgestrichen und anschließend die kathodische Platte des Elektroblotters aufgesetzt. Der Transfer der Proteine erfolgte mit Hilfe eines Blue Power 500 Power Supply<sup>38</sup> bei einer Stromstärke von  $2,5 \text{ mA/cm}^2$  über eine Transferzeit von 40 Minuten.

### 3.5.3 Überprüfung des Proteintransfers mittels Ponceau-Färbung

Um den Proteintransfer auf die PVDF-Membran zu überprüfen, wurde die Membran für 10 Minuten in Ponceau S-Färbelösung inkubiert. Die Ponceau S-Färbung hat eine Sensitivität von 250 – 500 ng Protein (Salinovich and Montelaro 1986). Im Anschluss erfolgte ein Waschschrift in Aqua bidest., wodurch die Hintergrundfärbung entfernt und die Proteinbanden sichtbar gemacht werden konnten. Anschließend wurde die Membran durch Waschen in PBS-T komplett entfärbt.

### 3.5.4 Immunoblot

Im Anschluss an die Ponceau S-Färbung wurden die Membranen für eine Stunde bei RT mit 1% PVP-T blockiert um unspezifische Antikörperbindungen zu reduzieren. Nach dreimaligem Waschen der Membranen für jeweils 10 Minuten mit PBS-T folgte die Inkubation der Membranen über Nacht bei 4°C mit einem der zu testenden primären Antikörper in passender Verdünnung. Sollten mehrere Antikörper auf einer

---

<sup>38</sup> Serva, Heidelberg

<sup>39</sup> GE Healthcare, Freiburg

<sup>40</sup> Roth, Karlsruhe

Membran getestet werden, wurde diese vorher in eine entsprechende Anzahl Streifen geschnitten. Nach erneutem Waschen der Membranen für dreimal 10 Minuten mit PBS-T erfolgte die Inkubation mit einem Peroxidase (POD)-konjugierten sekundären Antikörper in PBS-T für eine Stunde bei RT. Überschüssiger, nicht spezifisch an den primären Antikörper gebundener sekundärer Antikörper wurde durch sechs Waschschrte á 10 Minuten mit PBS-T entfernt. Die Lumineszenz der über die Antikörper an das Protein gebundenen POD wurde anhand von ECL detektiert. Dafür wurden die Membranen für 2 Minuten bei RT in der frisch angesetzten ECL-Lösung inkubiert und in eine Röntgenkassette eingelegt. Die Röntgenfilme (Euromed Plus green sensitive<sup>41</sup>) wurden je nach Intensität der Signale zwischen 15 Sekunden und 15 Minuten belichtet und anschließend in einem Curix 60 Röntgenfilmentwickler<sup>42</sup> entwickelt. Als primäre Antikörper wurden in dieser Arbeit für den Immunoblot von gesunden equinen PBL zum Screening der Antikörper-Klone gegen equines (eq) Septin7 alle Klone unverdünnt eingesetzt. Der Klon 12E10 fand außerdem, ebenfalls unverdünnt, Anwendung bei der Detektion von Septin7 in den Western Blots der Immunpräzipitationsexperimente (Kap 3.9.2.1 und 3.9.2.3) und bei der Kontrolle des Silencingerfolgs von Septin7 in equinen peripheren Lymphozyten (Kap. 3.12.2). Die Blotmembran wurde im Fall des Blots zur Untersuchung des Septin7-Silencing-Effekts zum Entfernen der ECL-Lösung in Aqua bidest. gewaschen und für die statistische Auswertung mit einem anti-GAPDH-Antikörper und entsprechendem sekundären Antikörper wie oben beschrieben reinkubiert und entwickelt. Für Western Blots in dieser Arbeit wurden folgende kommerziell erhältliche primäre Antikörper verwendet:

Antikörper	Produziert in	Klonalität	Firma/Herkunft	Verdünnung
Anti-Mensch-Septin7	Kaninchen	polyklonal	Santa Cruz, Heidelberg	1:200
Anti-Kaninchen-GAPDH	Maus	monoklonal	Merck Millipore, Darmstadt	1:500
Anti-Mensch-Vimentin	Maus	monoklonal	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	1:200
Anti-Rind-Lactotransferrin	Ziege	polyklonal	Biomol, Hamburg	1:1000

<sup>41</sup> Christiansen, Planegg

<sup>42</sup> Agfa, Bonn



Als sekundäre Antikörper fanden folgende POD-gekoppelte Antikörper Verwendung:

Antikörper	Produziert in	Klonalität	Firma/Herkunft	Verdünnung
Anti-Maus IgG2a	Ratte	monoklonal	Dr. E. Kremmer, Helmholtz Zentrum, München	1:8000
Anti-Ratte IgG1	Maus	monoklonal	Dr. E. Kremmer, Helmholtz Zentrum, München	1:8000
Anti-Ratte IgG2a	Maus	monoklonal	Dr. E. Kremmer, Helmholtz Zentrum, München	1:8000
Anti-Ratte IgG2c	Maus	monoklonal	Dr. E. Kremmer, Helmholtz Zentrum, München	1:8000
Anti-Kaninchen IgG (H+L)	Ziege	polyklonal	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	1:3000
Anti-Maus IgG (H+L)	Ziege	polyklonal	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	1:5000
Anti-Ziege IgG (H+L)	Kaninchen	polyklonal	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	1:1000

Alle Antikörper wurden in PBS-T verdünnt.

### 3.5.5 Statistische Auswertung

Die Schwärzungsintensität der Septin7- und GAPDH-Banden des Blots zur Überprüfung des Septin7-Silencing-Erfolgs wurde mit Hilfe der frei zugänglichen Software ImageJ 1.46r<sup>43</sup> quantifiziert und zueinander ins Verhältnis gesetzt, um Ladungsunterschiede auszugleichen. Die so entstandenen relativen Werte der Septin7-Expression von ungesilenceten und gesilenceten PBL wurden im Kolmogorov-Smirnov-Test auf ihre Normalverteilung geprüft. Da keine Normalverteilung vorlag ( $p \leq 0,05$ ), wurde der Mann-Whitney-Test zur statistischen Auswertung herangezogen. In diesem Test war der Rückgang der Septin7-Expression in gesilenceten PBL mit  $p \leq 0,05$  statistisch signifikant.

<sup>43</sup> <http://imagej.nih.gov/ij/index.html>

### 3.6 Durchflusszytometrie

#### 3.6.1 Puffer und Lösungen für die Durchflusszytometrie

##### Fluoreszenzpuffer (Fluo-Puffer)

BSA (1%) 5,00 g  
 Natriumazid (1%) 0,50 ml  
 ad 500 ml PBS.  
 Bei 4°C max. 14 Tage lagern.

##### Permeabilisierungspuffer

BD Cytotfix/Cytoperm<sup>44</sup>, gebrauchsfertig

##### Waschpuffer für permeabilisierte Zellen

BD Perm/Wash<sup>44</sup> 5,00 ml  
 ad 50 ml Aqua bidest.

#### 3.6.2 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Equine Lymphozyten wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS) phänotypisiert.

Neben den anti-Septin7-Antikörper-Klonen, die unverdünnt Verwendung fanden, wurden folgende kommerziell erhältliche primäre Antikörper zur Phänotypisierung eingesetzt:

Antikörper (+ Farbstoff)	Isotyp	Firma/Herkunft	Verdünnung
Anti-Mensch-Septin7 <sup>45</sup>	Kaninchen IgG	Santa Cruz, Heidelberg	1:50
Anti-Mensch-Vimentin	Maus IgG1	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	1:20
Anti-Rind-Laktotransferrin	Ziege IgG	Biomol, Hamburg	1:20
Anti-Pferd-CD4	Maus IgG1	Serotec, Puchheim	1:10
Anti-Pferd-CD8alpha	Maus IgG1	Dr. L. Göhring, Pferdeklinik der LMU München	1:10
Anti-Mensch-CD79a	Maus IgG1	Dako, Hamburg	1:10

<sup>44</sup> Becton Dickinson, Heidelberg

<sup>45</sup> <http://datasheets.scbt.com/sc-20620.pdf>

Anti-Mensch-CD79a-PE	Maus IgG1	Dako, Hamburg	1:10
Anti-Mensch-CD177	Mouse IgG1	Serotec, Puchheim	1:50
Anti-Mensch-CD150	Ziege IgG	Santa Cruz, Heidelberg	1:20
Anti-Mensch-CD166	Kaninchen IgG	Santa Cruz, Heidelberg	1:20

Folgende sekundäre Antikörper wurden eingesetzt:

Antikörper + Farbstoff	Produziert in	Firma/Herkunft	Verdünnung
Anti-Kaninchen IgG (H+L)-Alexa 488	Ziege	Life Technologies, Karlsruhe	1:200
Anti-Maus IgG1-FITC	Ziege	Santa Cruz, Heidelberg	1:200
Anti-Maus IgG2a-FITC	Ziege	Santa Cruz, Heidelberg	1:200
Anti-Ratte IgG1-FITC	Maus	Dr. E. Kremmer, Helmholtz Zentrum, München	1:200
Anti-Ratte IgG2a-FITC	Maus	Dr. E. Kremmer, Helmholtz Zentrum, München	1:200
Anti-Ratte IgG2c-FITC	Maus	Dr. E. Kremmer, Helmholtz Zentrum, München	1:200
Anti-Ziege IgG (H+L)-Alexa 488	Esel	Life Technologies, Karlsruhe	1:200
Anti-Maus IgG (H+L)-Cy5	Ziege	Linaris, Dossenheim	1:250
Anti-Ratte IgG2c-Cy5	Maus	Dr. E. Kremmer, Helmholtz Zentrum, München	1:250
Anti-Maus IgG1-PE	Ziege	Santa Cruz, Heidelberg	1:300

Alle Antikörper wurden in Fluo-Puffer oder, bei permeabilisierten Zellen, in Waschpuffer für permeabilisierte Zellen verdünnt.

### 3.6.3 Fluoreszenzfärbung von PBL für die Durchflusszytometrie

#### 3.6.3.1 Einfachfärbungen equiner PBL mit den anti-Septin7-Antikörper-Klonen

Zunächst wurden frisch präparierte PBL in PBS suspendiert und pro Delle einer 96-Loch Rundbodenplatte<sup>46</sup>  $1 \times 10^5$  Zellen einpipettiert, dann abzentrifugiert (800 rcf, 10 sec, 4°C), kräftig dekantiert und die verbleibenden Zellpellets mit 100 µl Permeabilisierungspuffer resuspendiert. Nach Abschluss der 20-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen zweimal mit je 200 µl Waschpuffer für permeabilisierte

<sup>46</sup> Sarstedt, Nürnbrecht

Zellen gewaschen (800 rcf, 10 sec, 4°C). Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit jeweils 30 µl eines der anti-Septin7-Antikörper-Klone pro Delle für 30 Minuten auf Eis. Es folgten zwei Waschschrte: Zentrifugieren (800 rcf, 10 sec, 4°C), Dekantieren und Resuspendieren in Waschpuffer für permeabilisierte Zellen mit abschließender erneuter Zentrifugation (800 rcf, 10 sec, 4°C). Anschließend wurden die Zellen mit 30 µl der entsprechenden Verdünnung des passenden sekundären Antikörpers (siehe Liste sekundäre Antikörper, Kap. 3.6.2) inkubiert (30 min, auf Eis). Die Inkubationsschritte erfolgten ab dem Einsatz der fluoreszenzmarkierten Antikörper im weiteren Verlauf abgedunkelt. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgten zwei weitere Waschschrte (800 rcf, 10 sec, 4°C) mit Waschpuffer für permeabilisierte Zellen. Am Ende des Waschvorgangs wurden die Zellen in 200 µl Waschpuffer für permeabilisierte Zellen resuspendiert und zur Messung ins FACSCanto II<sup>47</sup> eingespeist.

### **3.6.3.2 Doppelfärbung von Septin7, Vimentin oder Laktotransferrin und Lymphozytensubpopulationsmarkern auf equinen Lymphozyten**

Auch hier wurden  $1 \times 10^5$  frische Zellen, respektive PBL gesunder Pferde, PBL oder VL von ERU-Pferden, pro Delle einer 96-Loch Rundbodenplatte<sup>48</sup> einpipettiert, abzentrifugiert (800 rcf, 10 sec, 4°C) und kräftig dekantiert. Vor einer etwaigen Permeabilisierung wurde jedoch die Färbung des Lymphozytensubpopulationsmarkers (CD4, CD8 oder CD79α) durchgeführt. Dafür wurden die nach der Zentrifugation entstandenen Zellpellets mit je 30 µl der entsprechenden Verdünnung des primären Antikörpers (Liste primäre Antikörper, Kap. 3.6.2) resuspendiert und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Wie oben bereits beschrieben folgte nach zweimaligem Waschen, hier allerdings in Fluo-Puffer, die Inkubation mit dem passenden sekundären Antikörper (Liste sekundäre Antikörper Kap. 3.6.2). Die Inkubationsschritte erfolgten auch hier ab dem Einsatz der fluoreszenzmarkierten Antikörper im Dunkeln. Für die Analyse der Laktotransferrin-Expression auf Subpopulation von Lymphozyten wurden die beschriebenen Schritte nach erneutem zweimaligem Waschen in gleicher Weise für den anti-Laktotransferrin- und den entsprechenden sekundären Antikörper wiederholt.

Für die Septin7- und Vimentin-Doppelfärbungen wurden die Zellen nach der Färbung des Populationsmarkers permeabilisiert, wie in Kap. 3.6.3.1 beschrieben. Danach

---

<sup>47</sup> Becton Dickinson, Heidelberg

<sup>48</sup> Sarstedt, Nürnberg

wurde die Septin7- oder Vimentin-Färbung für permeabilisierte Zellen durchgeführt (Kap. 3.6.3.1).

Für Doppelfärbungen mit Vimentin war zusätzlich zwischen der ersten und zweiten Färbung eine Blockade notwendig, da es sich sowohl bei Vimentin als auch bei allen hier verwendeten Populationsmarkern um Antikörper vom Isotyp Maus IgG1 handelt. Zur Blockade wurden die Zellen im Anschluss an die Waschschriffe nach dem ersten sekundären Antikörper (Anti-Maus IgG (H+L)-Cy5) und vor der Permeabilisierung für 30 Minuten auf Eis mit 25%-igem Mäuseserum inkubiert. Überschüssige Blockade wurde durch zweimaliges Waschen entfernt und die zweite Färbung nach Durchführung der Permeabilisierung wie oben beschrieben durchgeführt. Hierfür wurde nun der isotypspezifische sekundäre Antikörper (Anti-Maus IgG1-FITC) verwendet. Für alle Färbungen wurden entsprechende Isotypkontrollen durchgeführt.

### **3.6.4 Detektion gefärbter Zellen mit dem Durchflusszytometer**

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie lässt sich die Proteinexpression von einzelnen Zellen und Zellpopulationen feststellen, die vorher mit einem Fluorchrom-markierten Antigen-spezifischen Antikörper gefärbt wurden. Der Prozentsatz der Zellen, die dieses Antigen exprimieren (Parent) und die Expressionsstärke dieses Antigens (mittlere Fluoreszenzintensität, MFI) können so für die getesteten Zellen ermittelt werden. In komplexen Proben können durch Doppelfärbungen mit verschiedenen Fluorchrom-markierten Zellmarkern Proteinexpressionen einzelner Lymphozytensubpopulationen, wie zum Beispiel T-Helferzellen (CD4<sup>+</sup>), analysiert werden.

Mit dem FACSCanto II<sup>49</sup> Immunzytometrie-System können tausende Zellen pro Sekunde detektiert werden. Das System besteht aus einem Argonlaser (488 nm) und einer roten Laserdiode (633 nm) und kann über bestimmte Filter bis zu vier Farben gleichzeitig wahrnehmen. Dies wird ermöglicht, da die zur Zellmarkierung genutzten Fluochrome sich zwar durch die gleiche Wellenlänge anregen lassen, jedoch unterschiedliche, Farbstoff-spezifische Emissionsspektren haben. Die Fluoreszenz-markierten Lymphozyten wurden hierfür aus den Dellen der 96-Loch-Platte<sup>50</sup> in das Durchflusszytometer<sup>49</sup> eingespeist und passierten durch hydrodynamische Fokussierung den gebündelten Argonlaserstrahl. Bei passender Wellenlänge wurden die

---

<sup>49</sup> Becton Dickinson, Heidelberg

<sup>50</sup> Sarstedt, Nürnberg

Elektronen der Fluorochrome auf ein höheres Energieniveau gehoben und fielen nach Beendigung der Anregung, unter Abgabe von Energie in Form von Photonen, wieder auf ihr ursprüngliches Energieniveau zurück. Diese Fluorchrom-spezifische Emission wurde über den Photodetektor (photomultiplier tube, PMT) des Durchflusszytometers<sup>51</sup>, der einen optischen Filter besitzt, registriert und in elektrische Impulse umgewandelt. Anschließend wurden die Impulse über den integrierten Analog-Digital-Wandler graphisch dargestellt und konnten weiter ausgewertet werden.

### **3.6.5 Auswertung der durchflusszytometrischen Daten**

Mit Hilfe der Software FACSDiva<sup>51</sup> wurde die detektierte Population der Lymphozyten selektiert. Die Bindung der getesteten Antikörper an die Lymphozyten wurde für Einfachfärbungen im Histogramm dargestellt. Dieses war durch eine Linie in zwei Bereiche unterteilt: der Bereich links der Trennlinie zeigte die nicht-Fluorchrom-gekoppelten (ungefärbten) Zellen, wohingegen der Bereich rechts der Linie die Fluorchrom-gekoppelten (gefärbten) Zellen enthielt. Bei Doppelfärbungen waren die gefärbten und ungefärbten Zellen in vier Quadranten eines Dot Plots aufgetragen: der linke untere Quadrant enthielt die doppelt negativen Zellen, der linke obere und der rechte untere Quadrant enthielt die jeweils für ein getestetes Antigen positiven, und der rechte obere Quadrant die für beide Antigene (doppelt) positiven Zellen. Für die positiven Zellen wurden zwei Werte angegeben. Der Parent-Wert bezeichnet den prozentualen Anteil der Zellen, an die der zugegebene Antikörper gebunden hat, an der Gesamtzahl gemessener Zellen. Der MFI-Wert gibt dagegen an, wie stark das getestete Antigen von den angefärbten Zellen exprimiert wird. Für die Experimente zum Test der Antikörper-Klone gegen equines Septin7 wurde der MFI-Wert jedes Antikörper-Klons für Septin7 bestimmt und mit dem des entsprechenden Isotypkontrollantikörpers verglichen. Auch für die Bestimmung der Expressionsstärke von Septin7, CD150 und CD166 auf Lymphozyten unterschiedlichen Ursprungs (periphere Zellen von Kontrolle/ERU und/oder intraokuläre Zellen) wurde der MFI-Wert zur Auswertung herangezogen und für die Messung der Expression von Vimentin und Laktotransferrin auf einzelnen Subpopulationen wurden beide Werte, Parent und MFI, getrennt ausgewertet. Alle Proben, die mit der FACSDiva<sup>51</sup> Software nicht einheitlich gegatet werden konnten, wurden in der frei zugänglichen Flowing

---

<sup>51</sup> Becton Dickinson, Heidelberg

Software<sup>52</sup> (Version 2.5.1) einzeln händisch nachgegatet und anschließend wie beschrieben ausgewertet.

### **3.6.6 Statistische Auswertung der durchflusszytometrischen Daten**

Um zu ermitteln, ob die Expression von CD150 und CD166 zwischen Blut- und intraokulären Lymphozyten von ERU-Tieren signifikante Unterschiede aufwies, wurde zur statistischen Auswertung der jeweilige MFI der Expression in VL-Lymphozyten auf den MFI der Blutlymphozyten des gleichen Tieres bezogen. Bei der Untersuchung der Expressionsänderung von Septin7 und Laktotransferrin wurden zusätzlich die MFIs der peripheren Lymphozyten gesunder Pferde auf die der ERU-Tiere bezogen. Zuvor wurde von jedem MFI der MFI-Wert der zugehörigen Isotypkontrolle abgezogen. So entstanden Faktoren, die die relative Änderung der Expression in vitrealen Lymphozyten (CD150 und CD166) bzw. in vitrealen Lymphozyten von ERU-Tieren und Blutlymphozyten gesunder Tiere (Septin7 und Laktotransferrin) im Vergleich zur Expression in Blutlymphozyten ERU-kranker Tiere angeben. Mit Hilfe dieser Änderungsfaktoren konnten Daten aus mehreren technisch unabhängigen Experimenten miteinander verglichen werden (jeweils normalisiert auf MFI Blutlymphozyten ERU). Die prozentualen Anteile Laktotransferrin-positiver Zellen aus verschiedenen Experimenten wurden als absolute Werte der statistischen Analyse zugeführt und direkt verglichen.

Die erhaltenen Werte wurden anhand des Kolmogorov-Smirnov-Tests auf ihre Normalverteilung geprüft. Bei statistischer Signifikanz des Kolmogorov-Smirnov-Tests ( $p \leq 0,05$ ) lag keine Normalverteilung vor und der Mann-Whitney-Test wurde zur weiteren statistischen Auswertung herangezogen (Septin7, Laktotransferrin zwischen peripheren Lymphozyten gesunder und ERU-kranker Tiere, CD150, CD166). Lag eine Normalverteilung ( $p \geq 0,05$ ) vor, wurde der Student's *t*-Test verwendet (Laktotransferrin zwischen peripheren Lymphozyten und VL bei ERU).

---

<sup>52</sup> Perttu Terho, Turku Centre for Biotechnology, Finnland;  
<http://www.flowingsoftware.com/index.php?page=33>

### 3.7 Immunzytochemie

#### 3.7.1 Puffer und Lösungen für die Immunzytochemie

##### Fluoreszenzpuffer (Fluo-Puffer)

BSA (1%)	5,00 g
Natriumazid (1%)	0,50 ml
ad 500 ml PBS.	
Bei 4°C max. 14 Tage lagern.	

##### Permeabilisierungspuffer

BD Cytotfix/Cytoperm<sup>53</sup>, gebrauchsfertig.

##### Waschpuffer für permeabilisierte Zellen

BD Perm/Wash <sup>53</sup>	5,00 ml
ad 50 ml Aqua bidest.	

##### 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)

DAPI<sup>54</sup>, gebrauchsfertig.

#### 3.7.2 Antikörper für die Immunzytochemie

Für die Beurteilung der Eignung der anti-eqSeptin7-Antikörper-Klone zur Detektion von Septin7 in immunzytologischen Untersuchungen wurde jeder der stabilisierten Klone pur eingesetzt. Der immunzytologische Nachweis von Septin7 auf Subpopulationen von peripheren und intraokulären Lymphozyten bei der ERU wurde mit Hilfe des anti-eqSeptin7-Antikörper-Klons 26A4, der auch hier unverdünnt eingesetzt wurde, geführt. Außerdem wurden für die beiden immunzytologischen Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit noch folgende kommerziell erhältliche primäre Antikörper eingesetzt:

---

<sup>53</sup> Becton Dickinson, Heidelberg

<sup>54</sup> Invitrogen, Karlsruhe



Antikörper	Produziert in	Klonalität	Firma/Herkunft	Verdünnung
Anti-Mensch-Septin7	Kaninchen	polyklonal	Santa Cruz, Heidelberg	1:50
Anti-Pferd-CD4	Maus	monoklonal	Serotec, Puchheim	1:10
Anti-Pferd-CD8alpha	Maus	monoklonal	Dr. L. Göhring, Pferdekl. der LMU München	1:10
Anti-Pferd-IgM	Maus	monoklonal	Biozol, Eching	1:50

Folgende sekundäre Antikörper wurden eingesetzt:

Antikörper + Farbstoff	Produziert in	Firma/Herkunft	Verdünnung
Anti-Kaninchen IgG (H+L)-Alexa 488	Ziege	Life Technologies, Karlsruhe	1:200
Anti-Maus IgG2a-FITC	Ziege	Santa Cruz, Heidelberg	1:200
Anti-Ratte IgG1-FITC	Maus	Dr. E. Kremmer, Helmholtz Zentrum, München	1:200
Anti-Ratte IgG2a-FITC	Maus	Dr. E. Kremmer, Helmholtz Zentrum, München	1:200
Anti-Ratte IgG2c-FITC	Maus	Dr. E. Kremmer, Helmholtz Zentrum, München	1:200
Anti-Maus IgG (H+L)-Alexa 546	Ziege	Linaris, Dossenheim	1:500

Alle Antikörper wurden in Fluo-Puffer oder, bei permeabilisierten Zellen, in Waschpuffer für permeabilisierte Zellen, verdünnt.

### 3.7.3 Immunzytologische Färbung

Die immunzytologische Einfachfärbung von gesunden PBL für die Überprüfung des anti-Septin7-Antikörper-Bindungsmusters an equines Septin7 in dieser Methode, sowie die Doppelfärbung von Blut- und intraokulären Lymphozyten bei der ERU mit anti-Septin7-Antikörper und Lymphozytensubpopulationsmarkern (CD4, CD8 oder IgM) wurde in 96-Loch-Rundbodenlatten<sup>55</sup> analog zur Färbung für durchflusszytometrische Messungen (Kap. 3.6.3) durchgeführt. Abweichend war lediglich der Einsatz von 30 µl einer 1:1000 Verdünnung von 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)<sup>56</sup> gleichzeitig mit der Färbung des letzten sekundären Antikörpers. Nach diesem Schritt wurden die Zellen in der Platte zweimal gewaschen,

<sup>55</sup> Sarstedt, Nürnbrecht

<sup>56</sup> Invitrogen, Karlsruhe

abzentrifugiert (800 rcf, 10 sec, 4°C) und in 30 µl Fluo-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf einen Objektträger<sup>57</sup> aufgebracht, in einer Cytospin-Zentrifuge<sup>58</sup> abzentrifugiert und mit Fluorescent Mounting Medium<sup>59</sup> eingedeckelt. Auf die gleiche Weise wurden entsprechende Isotypkontrollfärbungen angefertigt. Die Auswertung und Dokumentation des Bindungsmusters der Antikörper an Lymphozyten erfolgte mit dem Mikroskop Axio Imager M1<sup>60</sup> und der Software Axio-Vision<sup>60</sup> (Version 4.10).

### 3.8 Immunhistochemie

#### 3.8.1 Puffer und Lösungen für die Immunhistochemie

##### **Bouin'sche Lösung**

Bouin's solution<sup>61</sup>, gebrauchsfertig.

##### **Ethanol 70%**

Ethanol absolut	700,00 ml
ad 1000 ml Aqua dest.	

##### **Ethanol 90%**

Ethanol absolut	900,00 ml
ad 1000 ml Aqua dest.	

##### **Isopropanol**

99,8% 2-Propanol (Isopropanol).

##### **Xylol**

Xylol, gebrauchsfertig.

---

<sup>57</sup> Medite, Burgdorf

<sup>58</sup> Hettich, Tuttlingen

<sup>59</sup> DAKO, Hamburg

<sup>60</sup> Carl Zeiss, Oberkochen

<sup>61</sup> Sigma-Aldrich, Taufkirchen

### **EDTA-Puffer**

EDTA (100 mM) 29,22 g  
in 1000 ml Aqua dest. lösen.  
pH auf 8,0 einstellen.

### **PBS**

PBS (Kap. 3.1.1).

### **PBS-T**

PBS-T (Kap. 3.5.1).

## **3.8.2 Paraffinschnittherstellung**

Von den in Paraffin eingebetteten Präparaten von equinen Mandibularlymphknoten wurden mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms (HM360)<sup>62</sup> Schnitte mit einer Dicke von 8 µm angefertigt. Diese wurden im Wasserbad auf beschichtete Objektträger<sup>63</sup> gezogen und anschließend auf einer Wärmeplatte (40°C) getrocknet. Um ein Abschwimmen der Präparate während der histologischen Färbeprozesse zu verhindern, wurden die Objektträger für 24 Stunden bei 39°C gelagert.

## **3.8.3 Entparaffinieren der Paraffinschnitte**

Die Schnitte wurden in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und rehydriert. Dazu wurden sie für zweimal 5 Minuten in Xylol, einmal 5 Minuten in Isopropanol, zweimal 5 Minuten in 96%-iges Ethanol, einmal 5 Minuten in 70%-iges Ethanol und abschließend für 10 Minuten in Aqua dest. gelegt. Anschließend wurden durch die Paraffinierung maskierte Proteinepitope durch 15-minütiges Kochen in EDTA-Puffer und dreimaliges Waschen in PBS-T für 5 Minuten für die immunhistochemische Färbung demaskiert.

---

<sup>62</sup> Microm, Walldorf

<sup>63</sup> Super Frost Plus, Neo Lab, Heidelberg

### 3.8.4 Immunhistochemische Färbung

Für die immunhistochemische Analyse wurden die stabilisierten anti-eqSeptin7-Antikörper-Klone unverdünnt eingesetzt. Als Positivkontrolle fand ein polyklonaler Kaninchen-anti-humaner Septin7-Antikörper<sup>64</sup> in einer Verdünnung von 1:50 Anwendung.

Folgende sekundäre Antikörper wurden eingesetzt:

Antikörper + Farbstoff	Produziert in	Firma/Herkunft	Verdünnung
Anti-Kaninchen IgG (H+L)-Alexa 488	Ziege	Life Technologies, Karlsruhe	1:500
Anti-Maus IgG2a-FITC	Ziege	Santa Cruz, Heidelberg	1:500
Anti-Ratte IgG1-FITC	Maus	Dr. E. Kremmer, Helmholtz Zentrum, München	1:200
Anti-Ratte IgG2a-FITC	Maus	Dr. E. Kremmer, Helmholtz Zentrum, München	1:200
Anti-Ratte IgG2c-FITC	Maus	Dr. E. Kremmer, Helmholtz Zentrum, München	1:200

Die demaskierten Lymphknotenschnitte wurden zu Beginn der Färbeprozedur für 45 Minuten mit 1% BSA in PBS-T + 5% Ziegen- bzw. Mäuseserum (abhängig von der Host-Spezies des sekundären Antikörpers) blockiert. Dann erfolgte die Inkubation mit jeweils einem der stabilisierten anti-eqSeptin7-Antikörper-Klone oder dem anti-humanen Septin7-Antikörper über Nacht bei 4°C. Es folgten drei Waschschrte in PBS-T zu je 5 Minuten und die Inkubation mit dem entsprechenden isotypspezifischen sekundären Antikörper für 30 Minuten bei RT. Gleichzeitig wurde eine Kernfärbung mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)<sup>65</sup> durchgeführt. Die Schnitte wurden erneut dreimal für je 5 Minuten in PBS-T gewaschen und abschließend mit Dako fluorescent Mounting Medium<sup>66</sup> eingedeckelt. Für alle Färbungen wurden entsprechende Isotypkontrollfärbungen angefertigt. Die Färbungen wurden mit dem Mikroskop Axio Imager M1<sup>67</sup> und der Software AxioVision 4.10<sup>67</sup> beurteilt und dokumentiert.

<sup>64</sup> Santa Cruz, Heidelberg

<sup>65</sup> Invitrogen, Karlsruhe

<sup>66</sup> DAKO, Hamburg

<sup>67</sup> Carl Zeiss, Oberkochen

## 3.9 Immunpräzipitation

### 3.9.1 Puffer und Lösungen für die Immunpräzipitation

#### TBS

TBS (Kap 3.1.1).

#### Lysepuffer IP1

Lysepuffer IP1 (Kap. 3.1.1).

#### Lysepuffer IP2

Lysepuffer IP2 (Kap. 3.1.1).

#### Lysepuffer IP3

Lysepuffer IP3 (Kap. 3.1.1).

#### Waschpuffer

Lysepuffer IP1, IP2 oder IP3  
ad 10 ml TBS.

2,50 ml

#### Blockierlösung

BSA (4%)  
in 10 ml TBS lösen.

400,00 mg

#### 2 x Lämmli-Puffer (reduzierend)

5 x Lämmli-Puffer (reduzierend) (Kap. 3.4.1)  
ad 500 µl Aqua bidest.

200,00 µl

### 3.9.2 Durchführung der Immunpräzipitation

Für die drei in dieser Arbeit aufgeführten Immunpräzipitationsexperimente wurden neben den sieben stabilen anti-eqSeptin7-Antikörper-Klonen, von denen jeweils ein Milliliter pro Ansatz Verwendung fand, noch folgende kommerziell erhältliche Antikörper eingesetzt:

Antikörper	Host	Hersteller	IP-Eignung laut Hersteller	eingesetzte Menge
Anti-Mensch Septin7	Kaninchen	Santa Cruz, Heidelberg	ja	25 µl
Anti-Mensch Vimentin	Maus	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	keine Angabe	10 µl
Anti-Rind Laktotransferrin	Ziege	Biomol, Hamburg	keine Angabe	5 µl

### 3.9.2.1 Screening-IP der stabilen anti-Septin7-Antikörper-Klone

Frisch präparierte, pelletierte Blutlymphozyten eines Kontrollpferdes wurden in 100 µl Lysepuffer IP1 pro  $3 \times 10^6$  Zellen aufgelöst und die Proteinkonzentration der Lysate bestimmt (Kap. 3.2). Für alle Waschschritte wurde Waschpuffer mit Lysepuffer IP1 verwendet.

Für jeden der sieben stabilen anti-Septin7-Antikörper-Klone, den polyklonalen anti-Septin7-Antikörper aus dem Kaninchen, sowie die insgesamt fünf zugehörigen Isotypkontrollen und eine Negativkontrolle wurden je 40 µl 50% Protein G Sepharose 4 Fast Flow Beads-Slurry<sup>68</sup> in 1,5 ml Reaktionsgefäße<sup>69</sup> abgefüllt und dreimal mit je 500 µl Waschpuffer gewaschen (1000 rcf, 30 sec, RT). Dann erfolgte die Zugabe der Antikörper bzw. TBS (Negativkontrolle) zu den gewaschenen Beads und eine einstündige Inkubation bei 4°C auf einem Rotationsrad zur Bindung der Antikörper an die Beads. Ungebundene Antikörper wurden im Anschluss durch Zentrifugieren (1000 rcf, 1 min, 4°C) und zweimaliges Waschen mit je 500 µl Waschpuffer entfernt. Daraufhin erfolgte die Blockade frei gebliebener Bindungsstellen an den Beads durch Inkubation mit 500 µl der Blockierlösung für eine Stunde bei 4°C auf dem Rotationsrad. Nach der Blockade, Zentrifugation (1000 rcf, 30 sec, 4°C) und zwei neuerlichen Waschschritten wurde das einem Milligramm Protein entsprechende Zelllysatsvolumen 1:4 mit TBS verdünnt, zu den Beads gegeben und für drei Stunden mit diesen bei 4°C auf dem Rotationsrad inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation durch Zentrifugation (1000 rcf, 2 min, 4°C) wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und die Beads erneut dreimal mit

<sup>68</sup> GE Healthcare, Freiburg

<sup>69</sup> Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

Waschpuffer und anschließend zweimal mit TBS gewaschen (1000 rcf, 30 sec, 4°C). Nach einem abschließenden Zentrifugationsschritt (1000 rcf, 2 min, 4°C) folgte die Elution des Präzipitats durch Zugabe von 60 µl reduzierendem 2 x Lämmli-Puffer und Inkubation für 15 Minuten auf dem Schüttler<sup>70</sup> (RT, 600 rpm). Die Elution wurde durch 5-minütiges Schütteln bei 70°C beendet. Die anschließende Zentrifugation bei 1000 rcf für zwei Minuten erlaubte das Abnehmen des eluierten Präzipitats ohne die Beads dabei aufzuwirbeln. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß<sup>70</sup> überführt und die Beads für zehn Minuten bei Raumtemperatur mit weiteren 40 µl reduzierenden 2 x Lämmli-Puffers geschüttelt (600 rpm). Nach erneuter Zentrifugation (1000 rcf, 2 min, 4°C) wurde der Überstand mit dem im vorherigen Schritt gewonnenen Präzipitat gepoolt und jeweils 25 µl davon mittels Western Blot auf die Anreicherung von Septin7 überprüft.

### **3.9.2.2 IP zur Identifikation von Septin7-Interaktoren**

Diese IP wurde weitestgehend analog zu dem in Kap. 3.9.2.1 beschriebenen Protokoll durchgeführt. Abweichend davon wurde für die Zelllyse Lysepuffer IP2 verwendet und auch der verwendete Waschpuffer basierte auf Lysepuffer IP2. Zur Immunpräzipitation von Septin7 und seinen Interaktoren wurde der anti-Septin7-Antikörper-Klon 19A4 verwendet. Zusätzlich gab es noch einen Ansatz für die Isotypkontrolle des Antikörpers 19A4 (Ratte IgG2c). Im Anschluss an die Elution wurden die hier gewonnenen Präzipitate mittels FASP-Verdau (Kap. 3.11.1) für die Analyse im Massenspektrometer vorbereitet.

### **3.9.2.3 IP zur Bestätigung der Septin7-Interaktoren**

Auch hier fand, mit geringen Abweichungen, das in Kap. 3.9.2.1 beschriebene Protokoll Anwendung. Die erste Abweichung betraf auch hier den für die Zelllyse und Waschschriffe verwendeten Puffer; verwendet wurde Lysepuffer IP3. Zudem wurde hier ein Ansatz mit dem anti-eqSeptin7-Antikörperklon 19A4 und je ein weiterer für die Antikörper gegen die beiden zu testenden Septin7-Interaktoren (Vimentin und Laktotransferrin), sowie passende Isotyp- und Negativkontrollansätze angefertigt.

---

<sup>70</sup> Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

## 3.10. Plasmamembranproteinpräparation durch Oberflächenbiotinylierung

### 3.10.1 Puffer und Lösungen für die Oberflächenbiotinylierung

#### CaMg-Puffer pH 6,7 / 7,4

CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O (1 mM) 147,00 mg

MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O (0,5 mM) 102,00 mg

in 1000 ml PBS lösen.

pH auf 6,7 oder 7,4 einstellen.

#### Biotinylierungsreagenz

Natrium-(meta)periodat<sup>71</sup> (1 mM) 3,21 mg

Aminooxy-Biotin<sup>72</sup> (500 µM) 38,70 mg

Anilin<sup>73</sup> (10 mM, direkt vor der Verwendung hinzugeben) 1,37 mg

in 1 ml eiskaltem CaMg-Puffer pH 6,7 lösen.

#### Glycerol

Glycerol (100 mM) 9,21 mg

in 1 ml HPLC-Wasser<sup>71</sup> lösen.

#### 1 M Tris-HCl, pH 7,6 / 8,5

Tris<sup>74</sup> (1 M) 1,21 g

in 10 ml Aqua bidest. lösen.

pH auf 7,6 oder 8,5 einstellen.

#### Lysepuffer Oberflächenbiotinylierung (LP OB)

Nonidet P-40<sup>75</sup> (1%) 10,00 µl

5M NaCl (10 mM) 2,00 µl

1M Tris<sup>74</sup>-HCl pH 7,6 (10 mM) 10,00 µl

ad 1 ml HPLC-Wasser<sup>76</sup>.

---

<sup>71</sup> Merck Millipore, Darmstadt

<sup>72</sup> VWR, Ismaning

<sup>73</sup> Sigma-Aldrich, Deisenhofen

<sup>74</sup> Serva, Heidelberg

<sup>75</sup> Roche, Unterhaching

<sup>76</sup> Merck Millipore, Darmstadt



### Waschpuffer

Nonidet P-40<sup>77</sup> (0,2%) 10,00 µl  
ad 5 ml CaMg-Puffer pH 7,4.

### CaMg-Puffer mit SDS

SDS (0,5%) 10,00 mg  
in 2 ml CaMg-Puffer pH 7,4 lösen.

### CaMg-Puffer mit SDS und DTT

DTT<sup>78</sup> (100 mM) 15,00 mg  
ad 1 ml CaMg-Puffer mit SDS.

### Urea C (UC) Puffer

Harnstoff<sup>79</sup> (6 M) 720,67 mg  
1M Tris<sup>78</sup>-HCl, pH 8,5 (100 mM) 200,00 µl  
ad 2 ml HPLC-Wasser<sup>76</sup>.

### UC Puffer mit Iodacetamid (IA)

2-Iodacetamid<sup>79</sup> (50 mM) 9,25 mg  
in 1 ml UC Puffer lösen.

### 5 M NaCl

NaCl (5 M) 292,20 mg  
in 1 ml HPLC-Wasser<sup>76</sup> lösen.

### 100 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (100 mM) 106,00 mg  
in 1 ml HPLC-Wasser<sup>76</sup> lösen.  
pH auf 11,5 einstellen.

---

<sup>77</sup> Roche, Unterhaching

<sup>78</sup> Serva, Heidelberg

<sup>79</sup> GE Healthcare, Freiburg

### 50 mM Tris-HCl pH 8,5

1 M Tris-HCl pH 8,5 (50 mM) 50,00 µl  
ad 1 ml HPLC-Wasser<sup>80</sup>.

### Trypsin

Trypsin<sup>81</sup> (0,5 mg/ml) 20,00 µg  
in 40 µl Trypsin-Resuspensionspuffer<sup>81</sup> lösen.

### Trypsin-Puffer

Trypsin (0,025 mg/ml) 5,00 µl  
ad 100 µl 50 mM Tris-HCl pH 8,5.

### G7 Puffer

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (50 mM) 8,90 mg  
in 1 ml HPLC-Wasser<sup>80</sup> lösen.  
pH auf 7,5 einstellen.

### G7 Puffer mit PNGase F

PNGase F, glycerolfrei (500.000 Einheiten/ml)<sup>82</sup> 2,50 µl  
ad 50 µl G7 Puffer.

### Probenpuffer

Trifluoressigsäure<sup>83</sup> (2%) 20,00 µl  
Acetonitril<sup>83</sup> (20%) 200,00 µl  
ad 1 ml HPLC-Wasser<sup>80</sup>.

### Aktivierungslösung

Acetonitril<sup>83</sup> (50%) 500,00 µl  
ad 1 ml HPLC-Wasser<sup>80</sup>.

---

<sup>80</sup> Merck Millipore, Darmstadt

<sup>81</sup> Promega, Mannheim

<sup>82</sup> New England Biolabs, Frankfurt/Main

<sup>83</sup> Sigma-Aldrich, Deisenhofen

**Äquilibrationungslösung**

Trifluoressigsäure <sup>84</sup> (0,5%)	10,00 mg
Acetonitril <sup>84</sup> (5%)	100,00 µl
ad 2 ml HPLC-Wasser <sup>85</sup> .	

**Elutionspuffer**

Acetonitril <sup>84</sup> (70%)	35,00 µl
ad 50 µl HPLC-Wasser <sup>85</sup> .	

**3.10.2 Biotinylierung der Oberflächenproteine**

Für die differentielle Analyse des Oberflächenproteoms von peripheren Lymphozyten und intraokulären Lymphozyten eines an ERU erkrankten Pferdes wurden hoch lymphozytäre Proben verwendet (Lymphozytenanteil in den PBL > 90%). Von diesen Proben wurden Proteine der Plasmamembran von je  $8 \times 10^4$  frisch präparierten Zellen angereichert. Zuerst wurden die Zellen einmal mit 10 ml und einmal mit 1 ml eiskaltem CaMg-Puffer pH 6,7 gewaschen (400 rcf, 10 min, 4°C). Anschließend wurden die Zellpellets vorsichtig mit 200 µl Biotinylierungsreagenz invertiert und für 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln auf dem Rotationsrad inkubiert. Die Biotinylierung wurde durch 5 minütige Inkubation mit Glycerol in einer Endkonzentration von 1 mM (2 µl) bei 4°C gestoppt. Die Zellen wurden anschließend einmal mit 500 µl CaMg-Puffer pH 7,4 gewaschen (400 rcf, 10 min, 4°C).

**3.10.3 Anreicherung der biotinylierten Zelloberflächenproteine**

Die gewaschenen Pellets wurden in 200 µl LP OB resuspendiert und die Zellstruktur durch Inkubation bei 4°C für 30 Minuten auf dem Rotationsrad zerstört. Es folgte ein Zentrifugationsschritt (6000 rcf, 10 min, 4°C) und die Überführung des Überstandes in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß<sup>86</sup>. Anschließend wurde der Überstand im Verhältnis 1:5 mit CaMg-Puffer pH 7,4 verdünnt. 40 µl Strep-Tactin Superflow Beads<sup>87</sup> wurden mit Low Retention Pipettenspitzen<sup>86</sup> in ein frisches 1,5 ml LoBind Reaktionsgefäß<sup>86</sup> pipettiert, kurz invertiert und dreimal mit 500 µl Waschpuffer gewaschen (1000 rcf, 1 min, RT). Zur Bindung der Biotin-markierten Oberflächen-

---

<sup>84</sup> Sigma-Aldrich, Deisenhofen

<sup>85</sup> Merck Millipore, Darmstadt

<sup>86</sup> Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

<sup>87</sup> IBA, Göttingen

proteine an die Streptavidin-beschichteten Beads wurden die Proben auf die gewaschenen Beads gegeben und bei 4°C für zwei Stunden langsam rotierend inkubiert. Es folgten zwei Waschschriffe, einmal mit 200 µl Waschpuffer und einmal mit 200 µl CaMg-Puffer mit SDS (2000 rcf, 2 min, RT). Daraufhin wurden die Proben bei RT für 30 Minuten mit 200 µl CaMg-Puffer mit SDS und DTT inkubiert und erneut abzentrifugiert (2000 rcf, 2 min, RT). Nach einem weiteren Waschschriff mit 200 µl UC Puffer (2000 rcf, 2 min, RT) wurden die Beads mit 200 µl UC Puffer mit IA bei RT für 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Nach Zentrifugation (2000 rcf, 2 min, RT) und Verwerfen des Überstandes wurden die Beads je ein weiteres Mal mit 200 µl der folgenden Lösungen in der angegebenen Reihenfolge gewaschen: UC Puffer, 5 M NaCl, 100 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 50 mM Tris-HCl pH 8,5 (jeweils gefolgt von Zentrifugation bei 2000 rcf, 2 min, RT und Verwerfen des Überstands).

### **3.10.4 Proteinextraktion**

Die gewaschenen Beads mit den gebundenen biotinylierten Oberflächenproteinen wurden über Nacht bei 37°C mit 40 µl Trypsin-Puffer verdaut. Das Enzym Trypsin spaltet Proteine an Peptidbindungen spezifisch nach Arginin und Lysin. Diese gezielte Spaltung ermöglicht später die Zuordnung des entstandenen Peptids zu einem bestimmten Protein. Am nächsten Tag wurden die Proben zentrifugiert (2000 rcf, 2 min, RT) und die Überstände in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße<sup>88</sup> überführt (Überstand 1). Daraufhin wurden die Beads mit 40 µl 50 mM Tris-HCl pH 8,5 gewaschen, abzentrifugiert (2000 rcf, 2 min, RT) und der dabei entstehende Überstand mit Überstand 1 zur tryptischen Peptidfraktion zusammengeführt.

Die Beads wurden einmal in 40 µl G7 Puffer gewaschen und zentrifugiert (2000 rcf, 2 min, RT). Anschließend folgte die Spaltung N-glykosidischer Bindungen mittels Verdau durch 20 µl G7 Puffer mit PNGase F für 6 Stunden bei 37°C. Die Beads wurden abzentrifugiert (2000 rcf, 2 min, RT) und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß<sup>88</sup> überführt (Überstand 2). Der nach Resuspendieren der Beads in 20 µl G7 Puffer und anschließender Zentrifugation (2000 rcf, 2 min, RT) entstandene Überstand wurde mit Überstand 2 zur deglycosylierten Peptidfraktion zusammengeführt. Die tryptische und deglycosylierte Peptidfraktion wurden mit Trifluoressigsäure (TFA)<sup>89</sup> in einer Endkonzentration von 1% angesäuert.

---

<sup>88</sup> Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

<sup>89</sup> Sigma-Aldrich, Deisenhofen

### **3.10.5 Aufreinigung und Konzentration der deglycosylierten Peptidfraktion mittels PepClean Säulen**

Die deglycosylierte Peptidfraktion wurde mittels Pierce PepClean C18 Spin Columns<sup>90</sup> gereinigt und konzentriert. Diese Säulen enthalten ein C18-Granulat, an das die Peptide binden, um später konzentriert und gereinigt eluiert werden zu können. Die Säulen wurden in ein 1,5 ml LoBind Reaktionsgefäß<sup>91</sup> platziert und zwischen den folgenden Schritten bei RT und 1500 rcf für je 30 Sekunden zentrifugiert. Zuerst wurden die Proben in einem Verhältnis von 3:4 mit Probenpuffer verdünnt und die Säulen durch viermaliges Waschen mit je zweimal 200 µl Aktivierungslösung und zweimal 200 µl Äquilibrationlösung vorbereitet. Die Proben wurden anschließend auf die Säulen überführt, durch die Matrix zentrifugiert und derselbe Vorgang mit dem Durchlauf noch einmal wiederholt. Daraufhin wurden die Säulen zweimal mit 200 µl Äquilibrationlösung gewaschen und in ein neues 1,5 ml LoBind Reaktionsgefäß<sup>91</sup> überführt. Im Anschluss wurden die Peptide durch zweimaliges Waschen mit je 20 µl Elutionspuffer von der Säule abgelöst, gesammelt und anschließend lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde in der jeweiligen tryptischen Peptidfraktion gelöst, sodass die gesamte Oberflächenpeptidfraktion gemeinsam der massenspektrometrischen Analyse zugeführt werden konnte.

---

<sup>90</sup> Thermo Fisher Scientific, Bonn  
<sup>91</sup> Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

## 3.11 Massenspektrometrische Identifikation und Quantifizierung von Proteinen

### 3.11.1 FASP-Verdau der Immunpräzipitate

#### 3.11.1.1 Puffer und Lösungen für den FASP-Verdau

##### TBS

TBS (Kap. 3.9.1).

##### 100 mM DTT

DTT<sup>92</sup> (100 mM) 15,42 mg

direkt vor Gebrauch in 1 ml HPLC-Wasser<sup>93</sup> lösen.

##### Urea A (UA)-Puffer

Harnstoff<sup>94</sup> (8 M) 48,03 mg

1 M Tris-HCl pH 8,5 (100 mM) 100,00 µl

ad 1 ml HPLC-Wasser<sup>93</sup>.

##### 300 mM Iodacetamid

2-Jodacetamid<sup>94</sup> (300 mM) 2,77 mg

direkt vor Gebrauch in 50 µl HPLC-Wasser<sup>93</sup> lösen.

##### Ammoniumbicarbonat (ABC)-Puffer

NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (50 mM) 19,75 mg

in 5 ml HPLC-Wasser<sup>93</sup> lösen.

##### Lys-C

Lysyl Endopeptidase<sup>95</sup> (0,2 mg/ml) 20,00 µg

in 100 µl HPLC-Wasser<sup>93</sup> lösen.

##### Trypsin

Trypsin<sup>96</sup> (0,5 mg/ml) 20,00 µg

in 40 µl HPLC-Wasser<sup>97</sup> lösen.

---

<sup>92</sup> Serva, Heidelberg

<sup>93</sup> Merck Millipore, Darmstadt

<sup>94</sup> GE Healthcare, Freiburg

<sup>95</sup> Wako, Neuss

<sup>96</sup> Promega, Mannheim

**ABC-Puffer mit 2% Acetonitril (ACN)**

Acetonitril<sup>98</sup> (2%) 1,00 µl  
ad 50 µl ABC-Puffer.

**0,5% TFA**

99% Trifluoressigsäure<sup>98</sup> 15,00 µl  
ad 3 ml HPLC-Wasser<sup>97</sup>.

**3.11.1.2 Durchführung des FASP-Verdaus**

Die Eluate aus der Immunpräzipitation zur Identifikation von Septin7-Interaktoren (Kap. 3.9.2.2) wurden zur Vorbereitung auf ihre Untersuchung im Massenspektrometer einem Filter-aided Sample Preparation (FASP)-Verdau unterzogen. Die Proben wurden zuerst im Verhältnis 1:4 mit TBS verdünnt. Es folgten die Zugabe von 10 µl 100 mM DTT und eine 30-minütige Inkubation bei 60°C unter Schütteln (600 rpm). Im Anschluss wurden die Proben auf RT abgekühlt und mit je 100 µl UA-Puffer und 10 µl 300 mM Iodacetamid für 30 Minuten bei RT im Dunkeln inkubiert. In dieser Zeit wurden 30 kDa Cut-off-Filter<sup>97</sup> mit ABC-Puffer vorgewaschen (14000 rcf, 5 min, RT). Die Proben wurden auf die angefeuchteten Filter gegeben und abzentrifugiert (14000 rcf, 15 min, RT). Die Durchläufe wurden verworfen und die Filter anschließend dreimal mit 200 µl UA-Puffer und zweimal mit 100 µl ABC-Puffer gewaschen, wobei die Durchläufe ebenfalls verworfen wurden. Als nächstes erfolgte die Zugabe von je 50 µl ABC-Puffer und 5 µl Lys-C sowie, nach zweistündiger Inkubation bei RT, 4 µl Trypsin. Damit wurden die Filter bei 37°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben für 15 Minuten bei RT und 14000 rcf abzentrifugiert und die Durchläufe, die nun die Peptide enthielten, gesammelt (Durchlauf 1). Zuletzt wurden 20 µl ABC-Puffer mit 2% ACN auf die Filter gegeben, erneut abzentrifugiert (14000 rcf, 15 min, RT) und der Durchlauf mit Durchlauf 1 zusammengeführt. Die so gewonnenen Eluate wurden mit 0,5% TFA angesäuert und direkt für die LC-MS/MS verwendet.

---

<sup>97</sup> Merck Millipore, Darmstadt

<sup>98</sup> Sigma-Aldrich, Taufkirchen

### 3.11.2 LC-MS/MS

#### 3.11.2.1 Puffer und Lösungen für die massenspektrometrische Analyse

##### Puffer A

Acetonitril <sup>99</sup> (2%)	20,00 ml
Ameisensäure <sup>99</sup> (0,1%)	1,00 ml
ad 1000 ml HPLC-Wasser <sup>100</sup> .	

##### Puffer B

Acetonitril <sup>99</sup> (98%)	980,00 ml
Ameisensäure <sup>99</sup> (0,1%)	1,00 ml
ad 1000 ml HPLC-Wasser <sup>100</sup> .	

#### 3.11.2.2 Durchführung der massenspektrometrischen Untersuchung

Die Liquid-Chromatographie Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS)-Analyse wurde in Zusammenarbeit mit der Research Unit Protein Science des Deutschen Forschungszentrums für Gesundheit und Umwelt in den Räumen des Helmholtz Zentrums München durchgeführt. Die Analyse erfolgte mit einem Ultimate3000 nano HPLC System<sup>101</sup>, welches mittels einer Nano Spray Ionenquelle online an ein LTQ OrbitrapXL<sup>102</sup> Massenspektrometer gekoppelt ist. Das HPLC System ist mit einer Nano Trap Säule<sup>101</sup> (100 µm i.d. x 2 cm, gepackt mit Acclaim PepMap 100 C18, 5 µm, 100Å Material) und einer analytischen Säule<sup>101</sup> (75 µm i.d. x 15 cm, Acclaim PepMap 100 C18, 3 µm, 100Å Material) ausgestattet. Die Proben aus den beiden Experimenten zu Septin7-Interaktoren und Oberflächenproteinen auf peripheren Lymphozyten und VL bei der ERU wurden in getrennten Analysedurchgängen verarbeitet.

Zuerst erfolgte automatisch die Injektion der Proben und Ladung auf die Nano Trap Säule mit einer Fließgeschwindigkeit von 30 µl/Minute in 5% Puffer B und 95% Puffer A. Nach 5 Minuten wurden die Peptide von der Nano Trap Säule eluiert und auf der analytischen Säule aufgetrennt. Diese Auftrennung fand durch einen Gradienten von 5 - 50% Puffer B bei einer Flussrate von 300 nl/Minute über eine Zeit

---

<sup>99</sup> Sigma-Aldrich, Taufkirchen

<sup>100</sup> Merck Millipore, Darmstadt

<sup>101</sup> Dionex, Idstein

<sup>102</sup> Thermo Scientific, Bonn



von 140 Minuten statt. Restliche, auf der Säule verbliebene Peptide wurden durch einen kurzen Gradienten von 50 - 100% Puffer B innerhalb von 5 Minuten eluiert. Die Analyse der eluierten Peptide erfolgte direkt nach der Nano Spray Ionisierung in einem LTQ OrbitrapXL<sup>103</sup> Massenspektrometer. Dazu wurden die zehn intensivsten Peptidionen aus den Orbitrap MS Vorscans für die Fragmentanalyse in der linearen Ionenfalle ausgewählt. Als Auswahlkriterien wurden eine Intensität von mindestens 100 sowie eine minimal doppelte Ladung des Peptides festgesetzt. Der Wert für die normalisierte Kollisionsenergie (CID) wurde auf 35 festgesetzt. Die Detektion der sich daraus ergebenden Fragmente mit einer normalen Auflösung erfolgte in der linearen Ionenfalle. Ein hochauflösendes MS-Spektrum mit einer Halbwertsbreite (*engl.* full width half maximum) von 60.000 und einer Massenbandbreite von 200 - 2000 Da wurde in der Orbitrap während der Fragmentanalyse aufgenommen. Jedes Ion, das für die Fragmentierung selektiert wurde, wurde 30 Sekunden lang durch dynamischen Ausschluss von einer erneuten Fragmentierung ausgeschlossen (dynamic exclusion).

### 3.11.3 Quantitative Auswertung mit Progenesis

Die quantitative Auswertung erfolgte durch Frau Dr. Stefanie Hauck, Research Unit Protein Science, Helmholtz Zentrum München. Die durch das Masse/Ladungsverhältnis ( $m/z$ ) und die Detektionszeit ( $t$ ) der einzelnen Peptide erstellten Peptidkarten jeder Probe (MS-Spektren) sowie die zu den Peptiden aufgenommenen Fragmentspektren (MS/MS-Spektren) wurden in die Progenesis-Software<sup>104</sup> (Version 2.5) importiert und die Peptidkarten der einzelnen Proben miteinander verglichen. Um eine optimale Übereinstimmung der Peptidkarten verschiedener Proben zu erreichen, wurde die jeweils komplexeste Probe als Referenz ausgewählt und die anderen anhand von jeweils sechs manuell gesetzten Markierungen automatisch daran ausgerichtet. Einfach geladene Peptide oder Peptide mit einer Ladung von über sieben wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Nachdem die Proben über alle detektierten Peptide zueinander normalisiert waren, konnten die Spektren für die Datenbanksuche aus der Progenesis-Software<sup>104</sup> als Mascot Generic File (mgf) exportiert werden. Nach Identifizierung der

---

<sup>103</sup> Thermo Scientific, Bonn

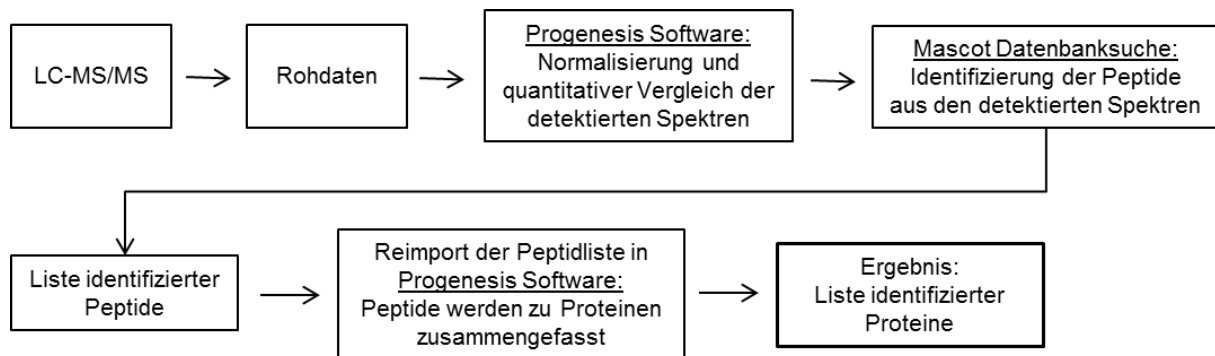
<sup>104</sup> Nonlinear Dynamics

Peptide in Mascot<sup>105</sup> (Kap. 3.11.4) wurden die Daten wieder in die Progenesis-Software reimportiert und die identifizierten Peptide Proteinen zugeordnet und deren jeweilige Abundanz berechnet.

### 3.11.4 Datenbanksuche für die mittels LC-MS/MS identifizierten Peptide

Die aufgenommenen MS/MS-Spektren wurden zur Identifikation der Peptide mit Mascot<sup>106</sup> (Matrix Science, Version 2.4.1) mit der Ensembl-Pferd-Datenbank<sup>107</sup> (Version 78, 2014) abgeglichen. Dabei wurde die Peptidtoleranz auf maximal 10 ppm und die Fragmentionentoleranz auf 0,6 Da festgesetzt. Cystein-Carbamidomethylierung wurde für die Analyse der Fragmentspektren als feste und Oxidierung von Methionin und Deamidierung von Asparagin und Glutamin als variable Modifikationen angegeben. Hier wurde maximal eine nicht geschnittene Spaltstelle erlaubt. Anhand der in Mascot integrierten Decoy-Datenbanksuche wurde die Falschpositivrate (*engl.* False discovery rate, FDR) abgeschätzt (minimale Ionen-Punktzahl von 13 im Percolator Suchalgorithmus,  $p < 0,01$ ) und kleiner 1% gehalten.

Eine schematische Darstellung der Arbeitsschritte der quantitativen LC-MS/MS Datenauswertung ist in folgender Grafik dargestellt (Abb. 3.1):



**Abb. 3.1:** Schema LC-MS/MS Datenauswertung; aus Fröhlich (2015).

<sup>105</sup> <http://www.matrixscience.com>

<sup>106</sup> <http://www.matrixscience.com>

<sup>107</sup> [http://www.ensembl.org/Equus\\_caballus/Info/Index](http://www.ensembl.org/Equus_caballus/Info/Index)

### 3.11.5 Suche und funktionelle Analyse von Orthologen und Paralogen

Identifizierte Pferdeproteine, für die noch keine Namen oder Gensymbole vorhanden waren, wurden in der frei verfügbaren Ensembl-Pferd-Datenbank<sup>108</sup> (Version 78, 2014) entsprechenden Orthologen oder Paralogen zugeordnet. Falls dort keine passenden Einträge gefunden werden konnten, wurden für das Protein anhand der Proteinsequenz mit Hilfe des NCBI BLAST Algorithmus<sup>109</sup> homologe equine Sequenzen ausgesucht.

Bereits bekannte Interaktionen zwischen den humanen Orthologen von Genen der hier als Septin7-Interaktoren identifizierten Pferdeproteine (Tab. 4.3) wurden mittels der frei zugänglichen Software String 9.1<sup>110</sup> identifiziert.

Die Analyse der Signalwege, an denen die zwischen peripheren Lymphozyten und VL bei der ERU differenziell exprimierten Zellmembranoberflächenproteine beteiligt sind (Tab. 4.4 und 4.5), wurde mittels der Software Genomatix 3.3<sup>111</sup> durchgeführt. Die Suche in Genomatix erfolgte, wie auch in String, mit den humanen Orthologen zu den Genen der identifizierten Proteine des Pferdes, da hierzu mehr Informationen in den Datenbanken vorhanden waren.

Alle verwendeten Datenbanken sind über das Internet zugänglich:

Ensembl: [http://www.ensembl.org/Equus\\_caballus/Info/Index](http://www.ensembl.org/Equus_caballus/Info/Index)

String: <http://string-db.org/>

Genomatix: <http://www.genomatix.de>

### 3.11.6 Auswertung der Proteinabundanzen

Zur Bewertung des Erfolgs der Septin7-Interaktorenanreicherung mittels Immunpräzipitation wurde für jedes identifizierte Protein der Quotient aus der Abundanz im Septin7-Präzipitat zu der entsprechenden Abundanz im Präzipitat der Isotypkontrolle berechnet (Ratio). Erst ab einer Ratio von 25 wurde die Anreicherung im Präzipitat des anti-Septin7-Antikörpers als ausreichend gewertet und das entsprechende Protein für weitere Untersuchungen in Betracht gezogen.

Die Ratio der differentiell regulierten Oberflächenproteine zwischen peripheren und intraokulären Lymphozyten wurde in beide Richtungen berechnet. Tab. 4.4 zeigt

---

<sup>108</sup> [http://www.ensembl.org/Equus\\_caballus/Info/Index](http://www.ensembl.org/Equus_caballus/Info/Index)

<sup>109</sup> <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

<sup>110</sup> <http://string-db.org/>

<sup>111</sup> <http://www.genomatix.de>

daher das Verhältnis der Abundanz des Proteins in peripheren Lymphozyten im Verhältnis zu der in intraokulären, wodurch der Faktor der Expressionssteigerung in peripheren Lymphozyten zum Ausdruck kommt. Hingegen gibt die Ratio in Tab. 4.5 an, wie stark die Abundanz der aufgeführten Proteine in intraokulären Lymphozyten die in peripheren Lymphozyten übersteigt. In diesen Tabellen sind Proteine mit mindestens zweifach differentiell regulierter Abundanz (Ratio  $\geq 2$ ) dargestellt.

## 3.12 RNA-Interferenz

### 3.12.1 Puffer und Lösungen für die RNA-Interferenz

#### RPMI

RPMI 1640 Medium mit Glutamin<sup>112</sup>, gebrauchsfertig.

#### RPMI +/+

Penicillin/Streptomycin <sup>112</sup>	5,00 ml
FCS	50,00 ml
ad 500 ml RPMI <sup>112</sup> .	

#### Septin7-siRNA

10  $\mu$ M siRNA Septin71, 2 und 3<sup>113</sup>, gebrauchsfertig.

#### siRNA-Dilutionspuffer

siRNA-Dilutionbuffer<sup>113</sup>, gebrauchsfertig.

#### N-TER-Peptide

N-TER-Peptide<sup>113</sup>, gebrauchsfertig.

#### RNase-freies Wasser

RNase-free water<sup>113</sup>, gebrauchsfertig.

#### Negativkontroll-siRNA

5  $\mu$ M siRNA Negativkontrolle<sup>113</sup>, gebrauchsfertig.

#### PBS

PBS (Kap. 3.1.1).

---

<sup>112</sup> Pan Biotech, Aidenbach

<sup>113</sup> Sigma-Aldrich, Taufkirchen

### 3.12.2 Reduktion der Septin7-Expression durch RNA-Interferenz

Um die Expression von Septin7 mit Hilfe von small interfering (si) RNA zu reduzieren, wurden je  $2 \times 10^6$  frisch präparierte equine PBL von vier gesunden Pferden in zwei Milliliter RPMI +/- in Dellen von 6-Loch-Platten<sup>114</sup> ausgesät und für eine Stunde bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Während dessen wurde das Silencing-Reagenz wie folgt vorbereitet. Je 13 µl jeder Septin7-siRNA und 113 µl siRNA-Dilutionspuffer wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße<sup>115</sup> vorgelegt und gut gemischt (Mix A). Weitere 1,5 ml Reaktionsgefäße<sup>115</sup> wurden mit je 24 µl N-TER-Peptide und 128 µl RNase-freiem Wasser bestückt (Mix B). Nach dieser Vorbereitung wurde Mix A zu Mix B gegeben, gemischt und für 30 Minuten bei RT inkubiert. Parallel dazu wurde auf gleiche Weise das Silencing-Kontroll-Reagenz hergestellt. Mix A enthielt hier 13 µl der Negativkontroll-siRNA und 38 µl siRNA-Dilutionspuffer, Mix B bestand aus 8 µl N-TER-Peptide und 43 µl RNase-freiem Wasser. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die fertigen Reagenzien in die mit Zellen bestückten 6-Loch-Platten<sup>114</sup> pipettiert. In die Hälfte der Dellen wurde das Silencing Reagenz gegeben, die andere Hälfte erhielt das Silencing-Kontroll-Reagenz. Nach 48-stündiger Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurden die Septin7-gesilencten und Kontroll-gesilencten Zellen geerntet, zweimal mit 37°C warmem PBS gewaschen (415 rcf, 10 min, RT), gezählt und frisch im Transmigrationsassay eingesetzt oder für die Analyse im Western Blot lysiert.

---

<sup>114</sup> Sarstedt, Nürnbergrecht

<sup>115</sup> Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

### **3.13 Blockade von CD166 auf der Oberfläche equiner PBL**

#### **3.13.1 Puffer und Lösungen für die CD166-Blockade**

##### **PBS**

PBS (Kap. 3.1.1).

#### **3.13.2 Dialyse des anti-CD166-Antikörpers**

Um die zytotoxischen Effekte von Natriumazid, welches den meisten Antikörperlösungen während der Produktion zur Konservierung zugesetzt wird, auszuschließen, wurde der anti-CD166-Antikörper für die Blockade von CD166 auf Pferdelymphozyten dialysiert.

In einem Dialysegefäß mit Cutoff von 3500 Da<sup>116</sup> wurden 20 µl der Antikörperlösung (entspricht 4 µg Protein) innerhalb von 24 Stunden bei 4°C gegen einen Liter PBS dialysiert. Mit dem entsprechenden Isotypkontrollantikörper wurde in gleicher Weise verfahren.

#### **3.13.3 Durchführung der CD166-Blockade**

Im Vorfeld des Transmigrationsexperiments mit CD166-blockierten Zellen wurden je  $3 \times 10^6$  frisch präparierte equine Lymphozyten abzentrifugiert (415 rcf, 10 min, 4°C) und im Volumenäquivalent eines Mykrogramms des dialysierten anti-CD166- bzw. Isotypkontrollantikörpers oder in der entsprechenden Menge PBS (Mediumkontrolle) resuspendiert. Nach einer Stunde bei 4°C wurden die Zellen abzentrifugiert (415 rcf, 10 min, 4°C) und sofort im Transmigrationsassay eingesetzt.

---

<sup>116</sup> Gibco Life Technologies, Karlsruhe

### 3.14 Transmigrationsassay

#### 3.14.1 Puffer und Lösungen für den Transmigrationsassay

##### **DMEM**

DMEM<sup>117</sup>, gebrauchsfertig.

##### **DMEM +/-**

Penicillin/Streptomycin <sup>117</sup>	5,00 ml
ad 500 ml DMEM <sup>117</sup> .	

##### **DMEM +/+**

Penicillin/Streptomycin <sup>117</sup>	5,00 ml
FCS <sup>117</sup>	50,00 ml
ad 500 ml DMEM <sup>117</sup> .	

##### **PBS**

PBS (Kap. 3.1.1).

#### 3.14.2 Durchführung der Transmigrationsassays Septin7-gesilencter und CD166-blockierter Zellen

Je  $1 \times 10^6$  gesunde equine RPE-Zellen der Passage 4 wurden in einem Milliliter DMEM +/+ auf die Unterseite von Transwell-Filtern mit einer Porengröße von  $8 \mu\text{m}$ <sup>118</sup> aufgebracht. Nach 48 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> hatte sich ein konfluent, einschichtiger Zellverband gebildet (Abb. 3.2).

---

<sup>117</sup> Pan Biotech, Aidenbach

<sup>118</sup> BD Biosciences, Heidelberg

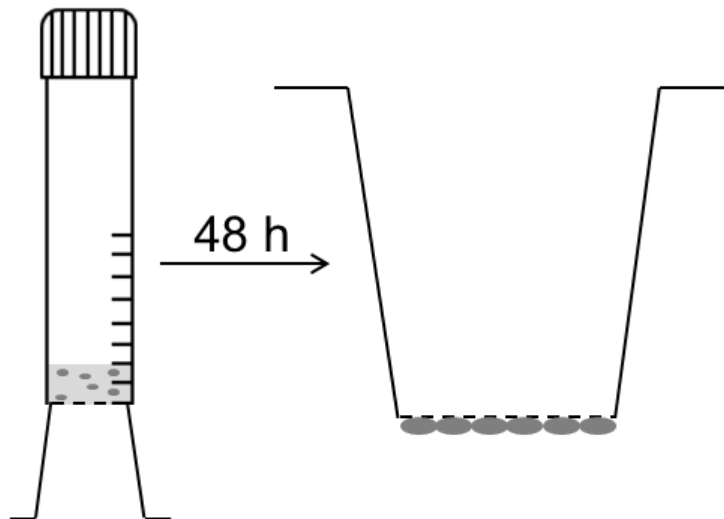


Abb. 3.2: Aufbringen von RPE-Zellen auf Transwell-Filter in physiologischer Ausrichtung.

Die so bewachsenen Transwell-Filter wurden vorsichtig in warmem PBS gewaschen und anschließend in Dellen einer 12-Loch-Platte<sup>119</sup> mit je 1,5 ml DMEM +/- eingelegt. Je  $3 \times 10^6$  Septin7-gesilencte und CD166-blockierte Lymphozyten sowie die Silencing- und Mediumkontrollzellen wurden nach dieser Vorbereitung in jeweils 0,5 ml 37° warmem DMEM resuspendiert und auf die Oberseite der Filtermembran gegeben. Nach 15, 30, 60, 120 und 180 Minuten wurden jeweils 10 µl aus dem unteren Kompartiment entnommen und die darin enthaltenen Lymphozyten gezählt. Nach drei Stunden zeigte sich in beiden Experimenten ein deutlich von den Kontrollzellen abweichendes Transmigrationsverhalten der gesilencten bzw. blockierten Zellen von dem der Kontrollen, sodass das Experiment durch Abnehmen der Lymphozytensuspension im oberen Kompartiment gestoppt wurde. Die Zellsuspensionen des unteren Kompartiments jedes Ansatzes wurden daraufhin in je ein 1,5 ml Reaktionsgefäß<sup>120</sup> überführt, abzentrifugiert (415 rcf, 10 min, RT) und nach Resuspendieren in PBS auf ihre Zellzahl überprüft.

<sup>119</sup> Sarstedt, Nürnberg

<sup>120</sup> Eppendorf, Wesseling-Berzdorf



## **4 ERGEBNISSE**

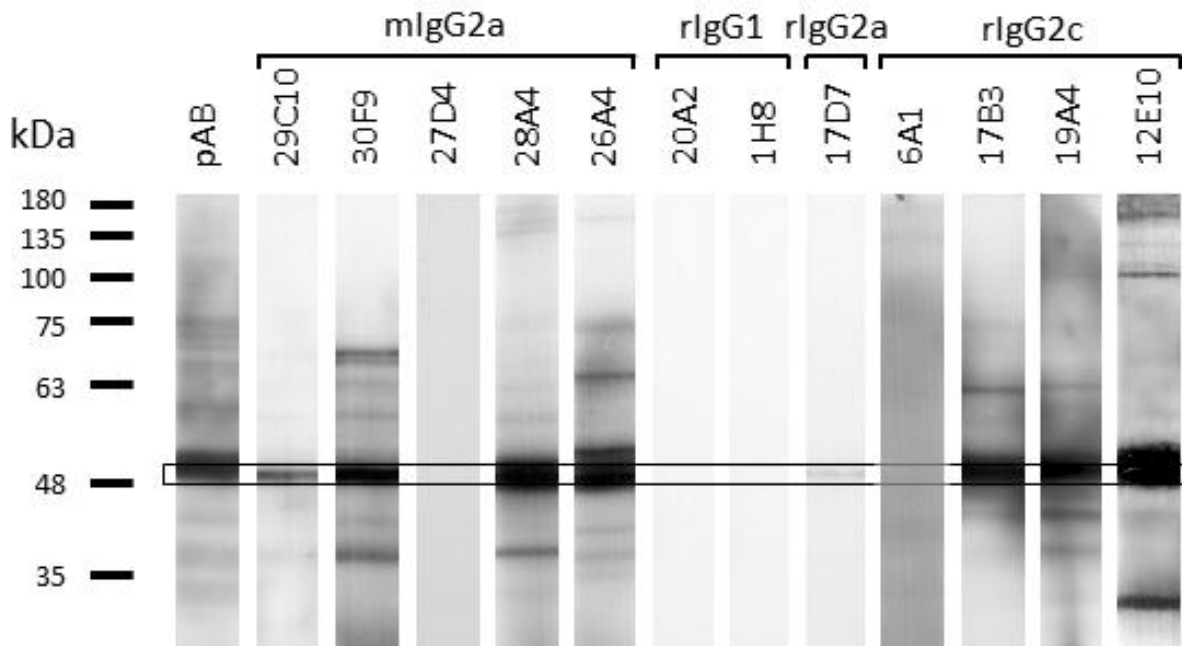
### **4.1 Charakterisierung der instabilen anti-Septin7-Antikörper-Klone**

#### **4.1.1 Untersuchungen der instabilen Klone weisen auf unterschiedliche Bindungseigenschaften hin**

Zur eingehenden Untersuchung der Rolle von Septin7 bei der equinen rezidivierenden Uveitis (ERU) war es notwendig, spezifische Antikörper zu erzeugen, da der von uns bis dato verwendete polyklonale anti-Septin7-Antikörper aus dem Kaninchen sich nicht für alle für uns relevanten Methoden eignete. Zwölf verschiedene Antikörper-Klone gegen equines (eq) Septin7 konnten durch unsere Kooperationspartnerin Frau Dr. Elisabeth Kremmer erfolgreich hergestellt werden und wurden im Anschluss daran von uns auf ihre Fähigkeit untersucht, Septin7 des Pferdes in verschiedenen Methoden zu detektieren.

##### **4.1.1.1 Im Western Blot detektieren acht Klone Septin7**

Zur Charakterisierung des Bindungsverhaltens der Antikörper-Klone gegen equines Septin7 wurde im Western Blot das Lysat peripherer Blutleukozyten (PBL) eines gesunden Pferdes aufgetrennt und auf Streifen dessen das Bindungsmuster der anti-eqSeptin7-Antikörper-Klone analysiert. Von den zwölf instabilen anti-eqSeptin7-Antikörper-Klonen waren acht in der Lage, Septin7 im Western Blot zu detektieren. Die Klone 27D4, 20A2, 1H8 und 6A1 konnten Septin7 hingegen nicht binden (Abb. 4.1 27D4, 20A2, 1H8 und 6A1). Ein Klon, 17D7, zeigte nur eine schwache Reaktion auf equines Septin7 (Abb. 4.1, 17D7) und ist, genauso wie die Klone 26A4 und 12E10 (Abb. 4.1 26A4 und 12E10), die neben einer deutlichen Septin7-Bindung auch unspezifische Reaktionen in direkter Nachbarschaft zu Septin7 hervorriefen, deshalb nur eingeschränkt für den Western Blot geeignet. Die restlichen fünf Klone (Abb. 4.1 29C10, 30F9, 28A4, 17B3 und 19A4) detektierten Septin7 im Western Blot sehr gut und waren damit für den Nachweis von Septin 7 des Pferdes mittels dieser Methode geeignet.



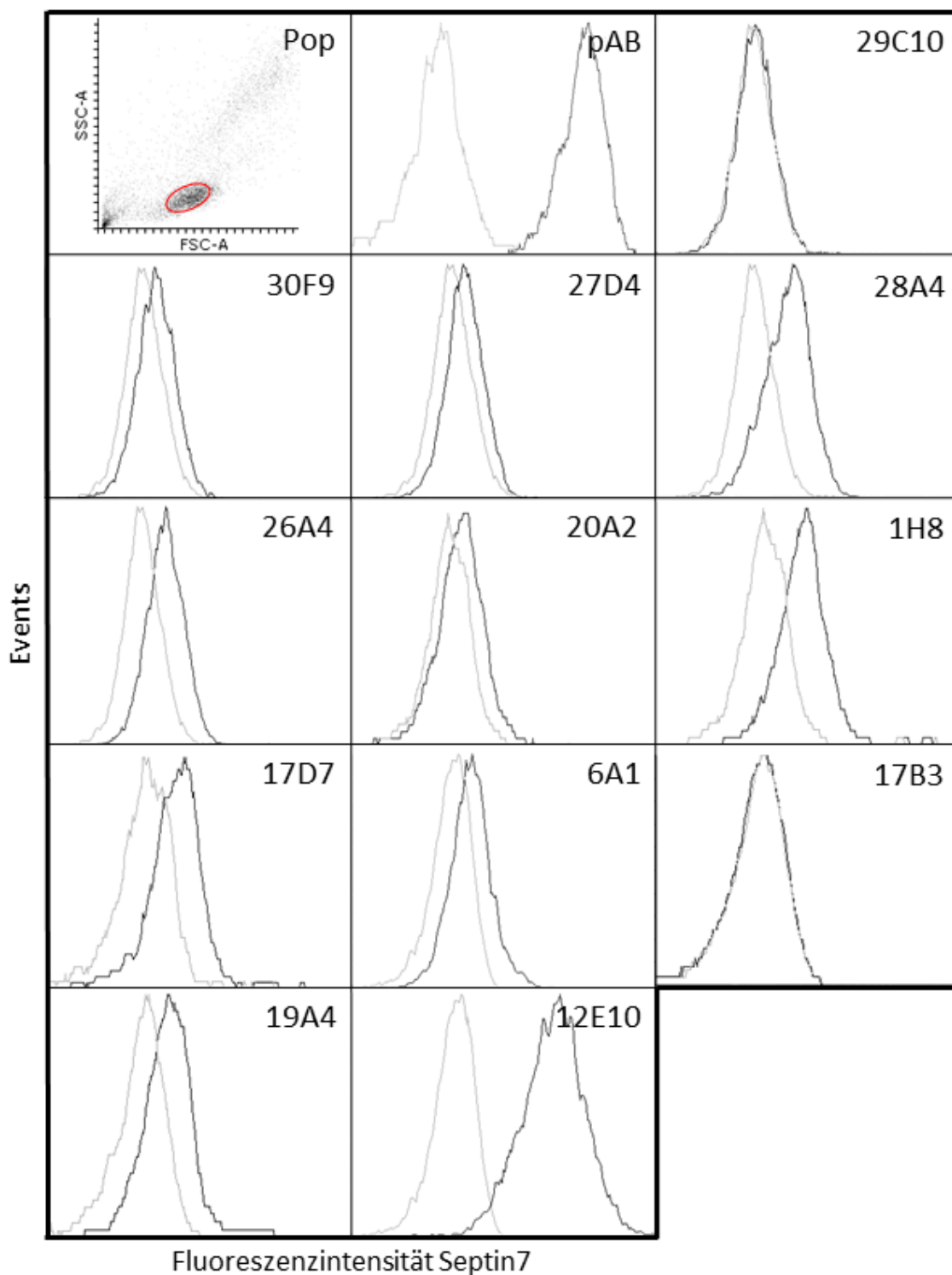
**Abb. 4.1:** Western Blot zum Bindungsverhalten der zwölf instabilen anti-Septin7-Antikörper-Klone an equine PBL.

mlgG = Isotyp Maus IgG; rlgG = Isotyp Ratte IgG; pAB = polyklonaler anti-Septin7-Antikörper aus dem Kaninchen. Der Kasten markiert die Höhe von Septin7 (ca. 49 kDa). Acht der zwölf Klone detektierten equines Septin7 im Western Blot.

#### 4.1.1.2 Ein Klon detektiert Septin7 in der Durchflusszytometrie

Im nächsten Schritt wurden die instabilen Antikörper-Klone auf ihre Eignung für die Detektion von Septin7 mittels Durchflusszytometrie (FACS) untersucht. Ein geeigneter Klon konnte dabei identifiziert werden.

In der durchflusszytometrischen Analyse banden zwei Klone (Abb. 4.2 29C10, und 17B3) nicht an die equinen Lymphozyten. Weitere neun Klone (Abb. 4.2 30F9, 27D4, 28A4, 26A4, 20A2, 1H8, 17D7, 6A1 und 19A4) reagierten nur schwach auf Septin7 und sollten für diese Methode keine Verwendung finden. Nur ein Klon (Abb. 4.2 12E10) band deutlich an Septin7 der equinen Lymphozyten und eignete sich somit für die Detektion des Proteins in der Durchflusszytometrie.



**Abb. 4.2:** Bindungsverhalten der instabilen anti-eqSeptin7-Antikörper-Klone an Septin7 in der Durchflusssyztometrie. Dargestellt sind Überlagerungshistogramme der anti-eqSeptin7-Antikörper-Klone (schwarzer Graph) und entsprechender Isotypkontrollen (grauer Graph).

Die X-Achse bezeichnet die Fluoreszenzintensität von Septin7, auf der Y-Achse ist die Zahl der gemessenen Events aufgetragen. Pop = Die Analyse der Bindungseigenschaften wurde an der Lymphozytenpopulation durchgeführt; pAB = Positivkontrolle, Bindung von eqSeptin7 durch den polyklonalen anti-huSeptin7-Antikörper aus dem Kaninchen. Der Klon 12E10 war am besten zur Detektion von Septin7 in der Durchflusssyztometrie geeignet.

#### 4.1.2 Sieben Klone wurden für die Stabilisierung ausgewählt

In den Vorversuchen detektierten insgesamt sechs Klone equines Septin7 sowohl im Western Blot als auch in der Durchflusszytometrie. Dabei handelte es sich um drei Klone der Isotypen Maus IgG2a (30F9, 28A4 und 26A4, Tab 4.1 Nr. 2, 4 und 5), von denen der Klon 30F9, wegen besserer durchflusszytometrischer Ergebnisse der anderen beiden Klone, nicht ausgewählt wurde, und zwei des Isotyps Ratte IgG2c (19A4 und 12E10, Tab. 4.1 Nr. 11 und 12) sowie um den Klon des Isotyps Ratte IgG2a (17D7; Tab. 4.1 Nr. 8). Die beiden Klone des Isotyps Ratte IgG1 (20A2 und 1H8, Tab 4.1 Nr. 6 und 7) hatten Septin7 im Western Blot nicht und in der FACS-Analyse nicht zufriedenstellend detektieren können, wurden aber im Hinblick auf weitere Methoden, die zuvor nicht getestet worden waren, dennoch ausgewählt, da eine möglichst große Isotypenvielfalt angestrebt wurde und sie im ELISA-Screening während der Herstellung der Antikörper-Klone positiv gewesen waren.

Nr.	Klon	Isotyp	Ergebnis Western Blot	Ergebnis FACS
1	29C10	Maus IgG2a	+++	-
2	30F9	Maus IgG2a	+++	+
3	27D4	Maus IgG2a	-	+
4	28A4	Maus IgG2a	+++	++
5	26A4	Maus IgG2a	++	++
6	20A2	Ratte IgG1	-	+
7	1H8	Ratte IgG1	-	++
8	17D7	Ratte IgG2a	+	++
9	6A1	Ratte IgG2c	-	+
10	17B3	Ratte IgG2c	+++	-
11	19A4	Ratte IgG2c	+++	++
12	12E10	Ratte IgG2c	++	+++

**Tab. 4.1:** Charakterisierung der anti-eqSeptin7-Antikörper-Klone in Western Blot und Durchflusszytometrie (FACS) vor Stabilisierung.

- : keine Bindung an Septin7.

+ : mäßige Bindung an Septin7.

++ : gute Bindung an Septin7.

+++ : sehr gute Bindung an Septin7.

Sieben Klone werden zur Stabilisierung ausgewählt (grau hinterlegt).

So erhielten wir zur Stabilisierung eine Auswahl von zwei Klonen pro Isotyp, mit Ausnahme von Ratte IgG2a, von dem von vornherein nur ein Antikörper zur Verfügung gestanden hatte.

Es wurden also sieben der zwölf instabilen Klone der Stabilisierung unterzogen, um in gleichbleibender Qualität für weitere Tests zur Verfügung zu stehen.

## **4.2 Nach der Stabilisierung liegen methodenspezifische Antikörper vor**

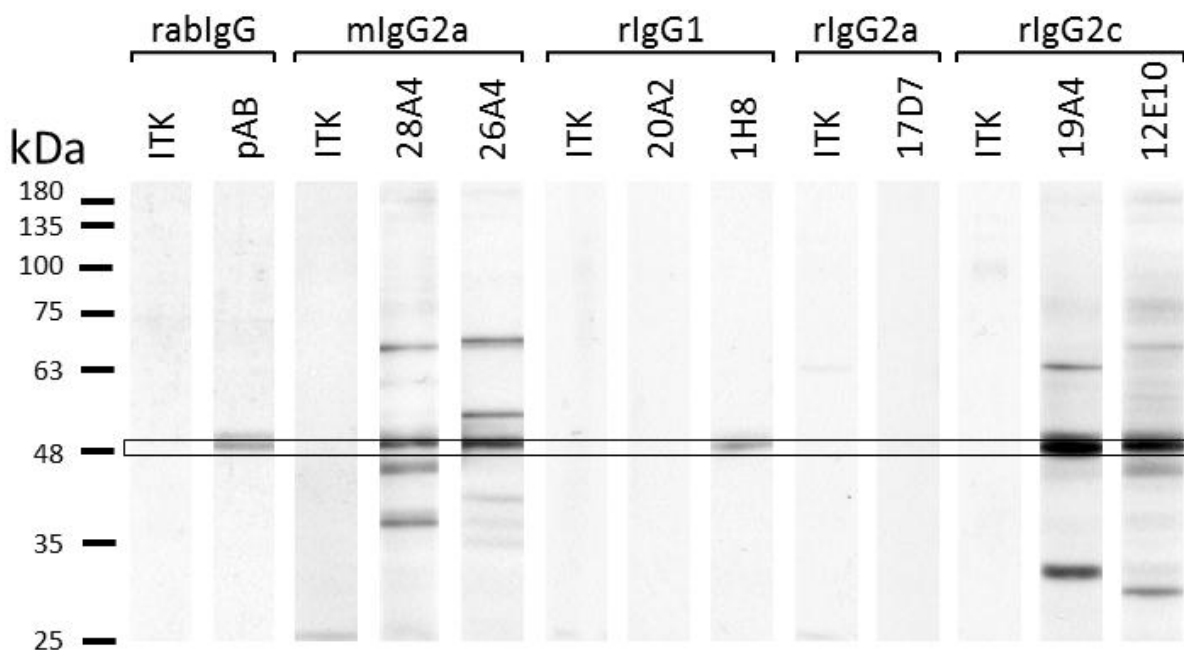
### **4.2.1 Untersuchungen der stabilisierten Klone bestätigen deren unterschiedliche Eignung für einzelne Methoden**

Nach erfolgreicher Stabilisierung führten wir erneut Western Blot- und durchflusszytometrische Analysen der Klone durch, um Aufschluss über eventuell aufgetretene Änderungen im Reaktionsverhalten der Antikörper zu erhalten. Außerdem erweiterten wir den Test um die Methoden Immunzytochemie (ICC), Immunhistochemie (IHC) und Immunpräzipitation (IP). Besonders die Eignung für die Immunpräzipitation war für uns von großem Interesse, da der bisher von uns verwendete polyklonale Antikörper aus dem Kaninchen in dieser Methode wiederholt nicht dazu in der Lage gewesen war, equines Septin7 anzureichern.

#### **4.2.1.1 Im Western Blot detektieren fünf stabile Klone equines Septin7**

Die stabilisierten anti-eqSeptin7-Antikörper-Klone wurden im Western Blot auf ihre Bindungseigenschaften an Septin7 getestet. Erfreulicherweise konnten fünf der sieben stabilisierten Klone equines Septin7 im Western Blot detektieren. Lediglich ein Klon hatte durch den Vorgang der Stabilisierung seine Eignung für die Detektion von Septin7 im Western Blot eingebüßt. Dabei handelte es sich um den Klon 17D7, der vor der Stabilisierung eine schwache Reaktion auf Septin7 im Western Blot gezeigt hatte (vgl. Abb. 4.1), sich nun aber, wie nach wie vor auch der Ratte-IgG1-Klon 20A2 (Abb. 4.3 20A2), negativ darstellte (Abb. 4.3 17D7). Die Klone des Isotyps Maus IgG2a und Ratte IgG2c detektierten Septin7 deutlich, banden jedoch auch verschieden stark unspezifisch an weitere Proteine (Abb. 4.3 28A4, 26A4, 19A4, 12E10). Da bei keiner der unspezifischen Banden Verwechslungsgefahr mit der spezifischen Septin7-Bande bestand, waren diese Klone für die Detektion von

Septin7 im Western Blot dennoch gut geeignet. Überraschenderweise zeigte der Klon 1H8 in allen nach der Stabilisierung durchgeführten Western Blots ausgezeichnete Bindungseigenschaften an Septin7 und stellte es sehr spezifisch dar (Abb. 4.3 1H8), obwohl der Klon in dem vor Stabilisierung angefertigten Western Blot Septin7 nicht hatte nachweisen können (vgl. Abb. 4.1). Da eine Verbesserung der Bindungseigenschaften im Zuge der Stabilisierung jedoch unwahrscheinlich ist, handelte es sich hierbei aller Wahrscheinlichkeit nach um technische Unterschiede zwischen den Western Blots vor und nach der Stabilisierung durch Reklonierung. Der Klon 1H8 war nun sehr gut für den Einsatz im Western Blot geeignet.

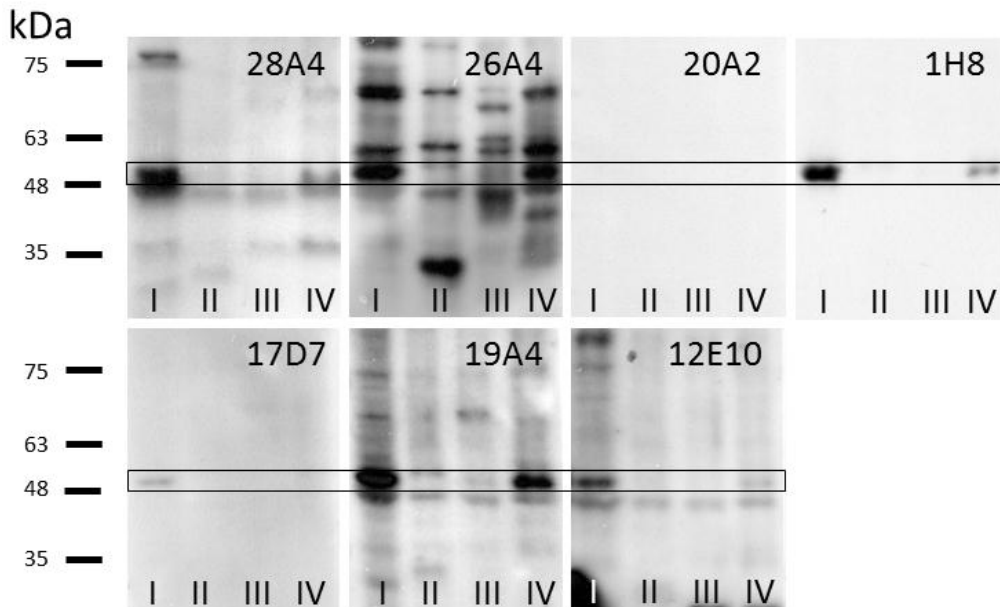


**Abb. 4.3:** Repräsentativer Western Blot zum Bindungsverhalten der monoklonalen anti-eqSeptin7-Antikörper-Klone an equine PBL. rablgG = Isotyp Kaninchen IgG; mlgG = Isotyp Maus IgG; rlgG = Isotyp Ratte IgG; ITK = Isotypkontrolle; pAB = polyklonaler anti-Septin7-Antikörper aus dem Kaninchen. Der Kasten markiert die Höhe von Septin7 (ca. 49 kDa).

Fünf der sieben stabilisierten Klone detektierten equines Septin7 im Western Blot.

Zur eingehenderen Charakterisierung der stabilisierten Klone wurde auch ihre Kreuzreaktivität mit Septin7 anderer Spezies im Western Blot überprüft. Der Klon 20A2, der equines Septin7 nicht detektieren konnte, band auch bei keiner anderen der getesteten Spezies (Abb. 4.4 20A2). Der Klon 17D7 hingegen, der nach der Stabilisierung equines Septin7 ebenfalls nicht detektierte, erkannte das humane Protein im Western Blot (Abb. 4.4 17D7, Streifen I). Jeweils beide Klone der Isotypen Maus IgG2a (Abb. 4.4 28A4 und 26A4) und Ratte IgG2c (Abb. 4.4 19A4 und 12E10) sowie

der Ratte IgG1-Klon 1H8 (Abb. 4.4 1H8) banden humanes Septin7 (jeweils Streifen I) zusätzlich zum equinen Protein (Streifen IV). Die Klone 26A4 und 19A4 detektierten außerdem schwach das Protein des Huhns und des Rindes (Abb. 4.4 26A4 und 19A4, Streifen II und III). Insgesamt waren also sechs der sieben Klone kreuzreaktiv mit humanem und zwei schwach mit gallinem und bovinem Septin7.

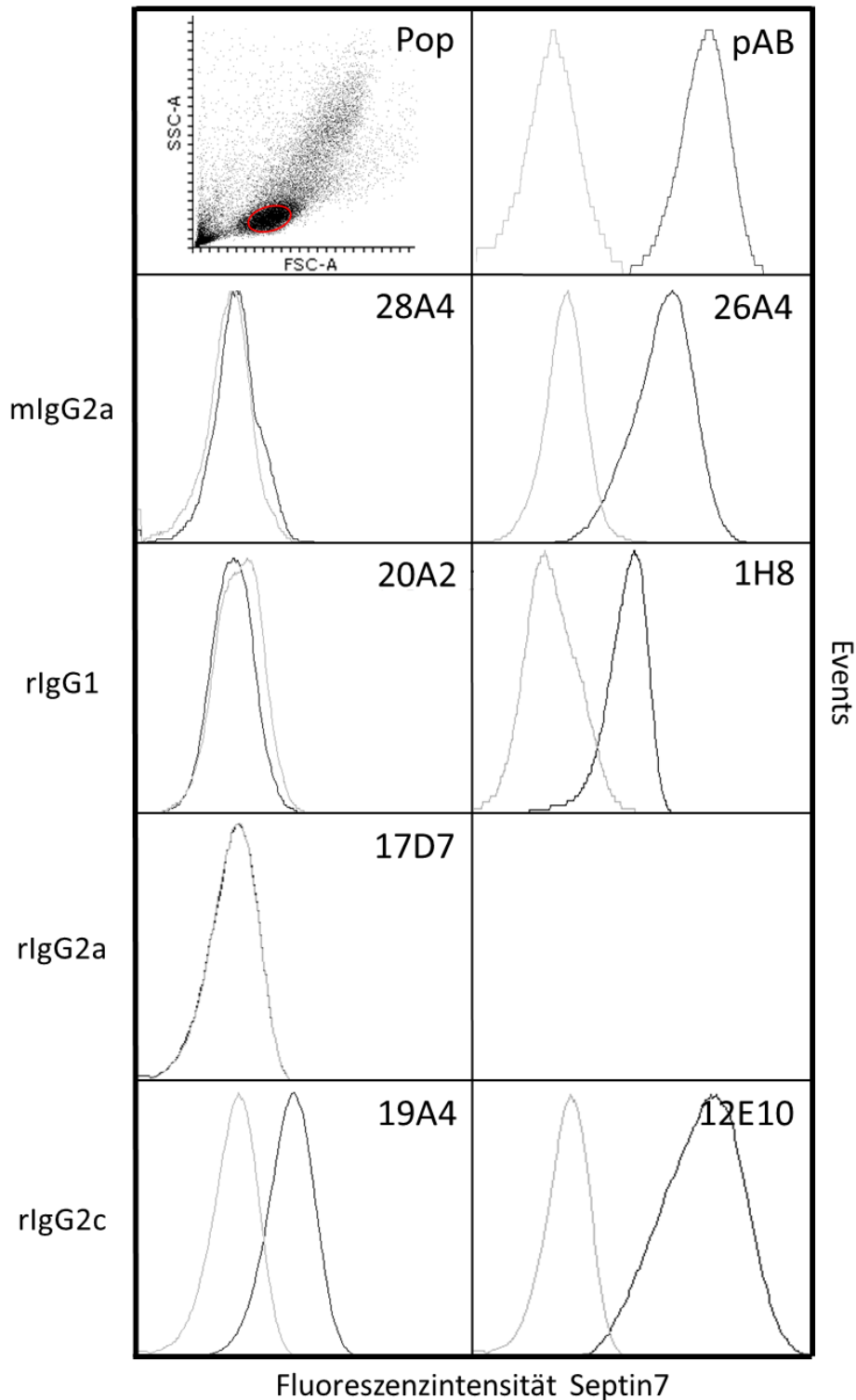


**Abb. 4.4:** Western Blots zum Bindungsverhalten der anti-eqSeptin7-Antikörper-Klone an humane (I), galline (II), bovine (III) und equine (IV) PBL.

Der Kasten markiert die Höhe von Septin7 (ca. 49 kDa). Sechs von sieben Klonen reagieren mit humanem, zwei auch mit gallinem und bovinem Septin7.

#### 4.2.1.2 Ein Klon detektiert Septin7 sehr gut in der Durchflusszytometrie

Auch für die Durchflusszytometrie konnte ein sehr gut zur Septin7-Detektion geeigneter Klon gefunden werden. Die Klone 28A2, 20A2 und 17D7 banden nach der Stabilisierung nicht mehr an Septin7 (Abb. 4.5 28A2, 20A2 und 17D7; vgl. Abb. 4.2). Auch der Klon 19A4 hatte durch die Stabilisierung an Qualität hinsichtlich der Septin7-Detektion in der Durchflusszytometrie verloren und band nun nur noch mäßig. Der Klon 1H8 zeigte in diesem Experiment, wie auch 26A4, eine weiterhin gute Bindungsaffinität an Septin7 in der Durchflusszytometrie (Abb. 4.5 1H8 und 26A4). Der Klon 12E10 reagierte nach wie vor sehr gut (Abb. 4.5 12E10). Nach der Stabilisierung eignete sich also ein Klon sehr gut und zwei weitere gut für die Detektion von Septin7 in der Durchflusszytometrie.



**Abb. 4.5:** Repräsentative Überlagerungshistogramme zum Bindungsverhalten der stabilen anti-eqSeptin7-Antikörper-Klone an Septin7 (schwarzer Graph) und entsprechender Isotypkontrollen (grauer Graph) in der Durchflusszytometrie von equinen Lymphozyten (n = 4).

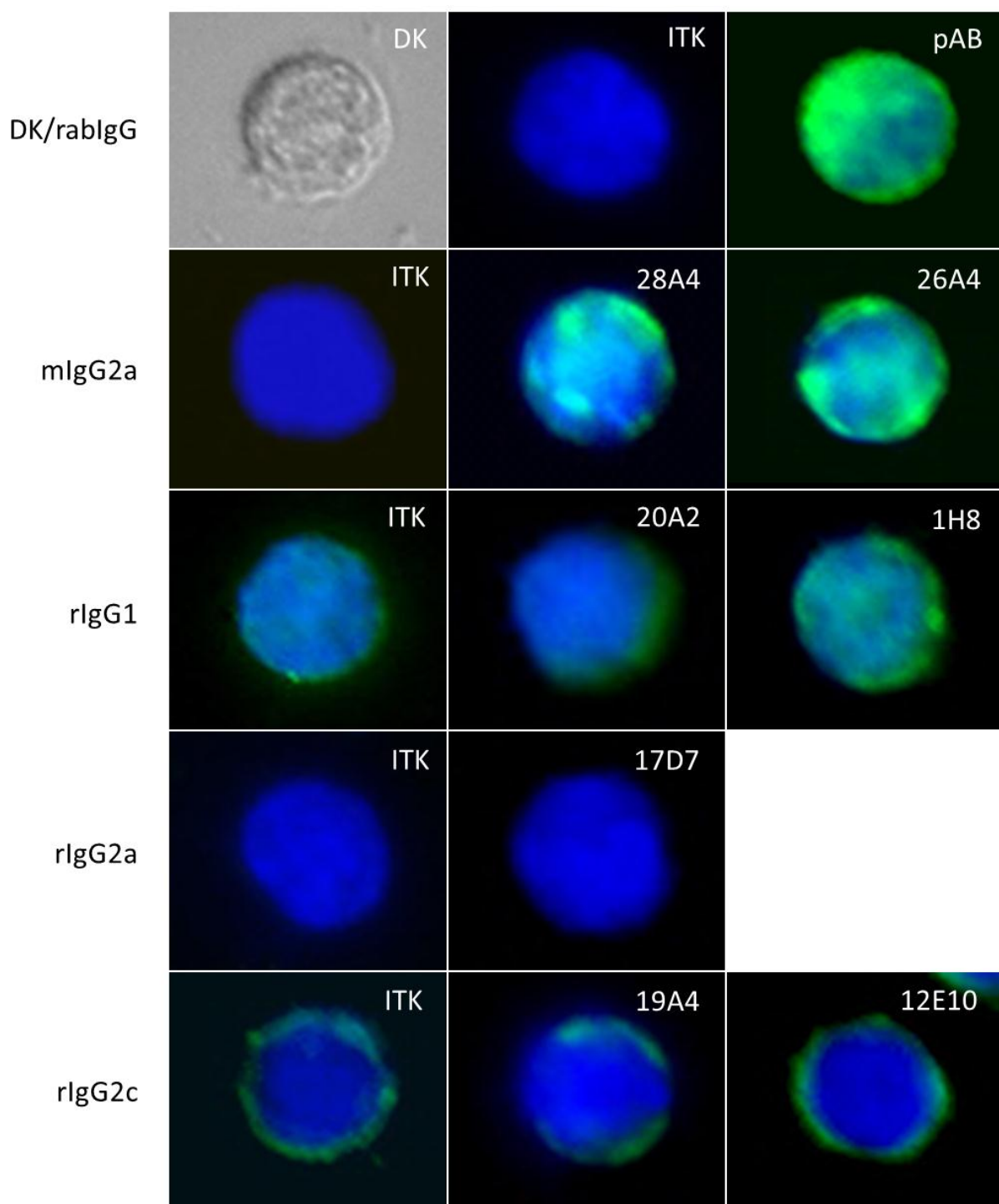
Die X-Achse bezeichnet die Fluoreszenzintensität von Septin7, auf der Y-Achse ist die Zahl der gemessenen Events aufgetragen. Pop: Die Analyse der Bindungseigenschaften wurde an der Lymphozytenpopulation durchgeführt; pAB: Positivkontrolle, Bindung von eqSeptin7 durch den polyklonalen anti-Septin7-Antikörper aus dem Kaninchen. Vier stabile Klone detektieren Septin7 in der Durchflusszytometrie, am besten der Klon 12E10.



#### **4.2.1.3 Drei der anti-Septin7-Antikörper-Klone können zur Detektion von equinem Septin7 in der Immunzytochemie eingesetzt werden**

Zur Überprüfung ihrer Eignung für eine weitere Methode wurden die stabilisierten Klone auf ihre Bindungseigenschaften an eqSeptin7 in der Immunzytochemie untersucht. Drei der Klone reagierten hier deutlich positiv, drei weitere schwächer.

Der Klon 17D7 war, wie seine Isotypkontrolle, negativ (Abb. 4.6 Panel rIgG2a). Die beiden Klone vom Isotyp Ratte IgG2c (19A4 und 12E10) zeigten zwar eine Reaktion, diese beschränkte sich jedoch ausschließlich auf die peripheren Zellbereiche, die wahrscheinlich nicht die gesamte Lokalisation von Septin7 widerspiegeln (Abb. 4.6, Panel rIgG2c). Die Reaktion glich zudem der der entsprechenden Isotypkontrolle, weshalb diese Klone nicht für die Immunzytochemie verwendet werden sollten. Bezogen auf ihre Isotypkontrolle reagierten die Klone des Isotyps Ratte IgG1 schwach (Abb. 4.6 Panel rIgG1), der Klon 1H8 hob sich jedoch positiv ab, da er ein stärkeres Bindungsmuster aufwies als der Klon 20A2 und vermehrt zytoplasmatische Strukturen anfärbte. Überzeugen konnten hier vor allem die Klone des Isotyps Maus IgG2a, 28A4 und 26A4 (Abb. 4.6, Panel mIgG2a), die Septin7 auf equinen PBL sehr gut bzw. gut anfärbten.



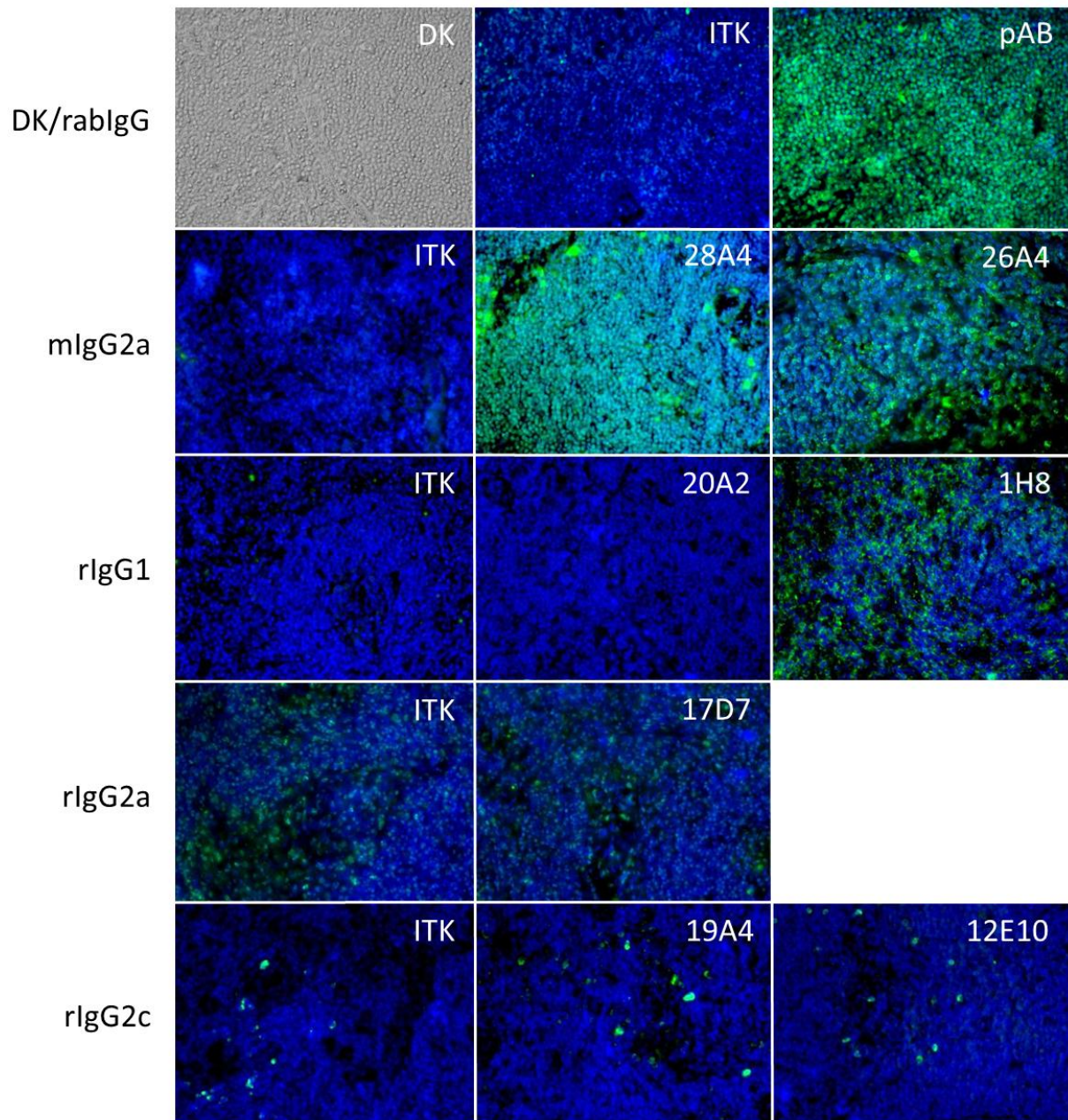
**Abb. 4.6:** Repräsentative Immunzytochemie zum Bindungsverhalten der stabilisierten anti-eqSeptin7-Antikörper-Klone an equine PBL.

Dargestellt sind die Differentialinterferenzkontrast-Aufnahme (DK), Isotypkontrollen (ITK) sowie die stabilisierten anti-eqSeptin7-Antikörper-Klone. Gebundener primärer Antikörper stellt sich grün dar, die Zellkerne sind in blau angefärbt (DAPI). rabIgG = Isotyp Kaninchen IgG; mIgG = Isotyp Maus IgG; rIgG = Isotyp Ratte IgG; pAB = polyklonaler anti-Septin7-Antikörper aus dem Kaninchen. Drei der sieben Antikörperklone detektierten eqSeptin7 gut bis sehr gut, drei weitere mäßig.

#### **4.2.1.4 Drei Klone detektieren equines Septin7 in der Immunhistochemie**

Auch in der Immunhistochemie wurden die stabilisierten Klone auf ihre Septin7-Bindungsaffinität getestet. Weitgehend stimmten die Ergebnisse dieser Untersuchung mit der der Immunzytochemie überein, jedoch gab es einige Ausnahmen. Vor allem war in der Immunhistochemie die ganzheitlichere Betrachtung eines Zellverbandes (hier Lymphknoten) möglich, wodurch, anders als in der Immunzytochemie, eine Differenzierung unspezifischer und spezifischer Reaktionen der anti-Septin7-Antikörper getroffen werden konnte. Drei der Antikörper-Klone waren geeignet, Septin7 in der Immunhistochemie zu detektieren.

Einer der Klone des Isotyps Ratte IgG1, 20A2, war in der Immunhistochemie gänzlich negativ, der zweite Ratte IgG1-Klon 1H8 zeigte sich jedoch als für die Immunhistochemie gut geeignet (Abb. 4.7 Panel rIgG1). Der Klon 17D7 vom Isotyp Ratte IgG2a zeigte das gleiche Bindungsmuster an Zellen des equinen Lymphknotens wie seine Isotypkontrolle (Abb. 4.7 Panel rIgG2a) und sollte deshalb nicht für immunhistochemische Studien zu Septin7 herangezogen werden. Das Reaktionsmuster der Ratte IgG2c-Klone 19A4 und 12E10 glich dem der entsprechenden Isotypkontrolle (Abb. 4.7 Panel rIgG2c). Auch diese eignen sich also nicht zur Detektion von Septin7 mittels der Immunhistochemie. Die besten Bindungseigenschaften zeigten auch hier die Klone 28A4 und 26A4, die beide eine deutliche Färbung des ubiquitär vorkommenden Septin7 in equinen Lymphknoten bewirkten (Abb. 4.7 Panel mIgG2a).



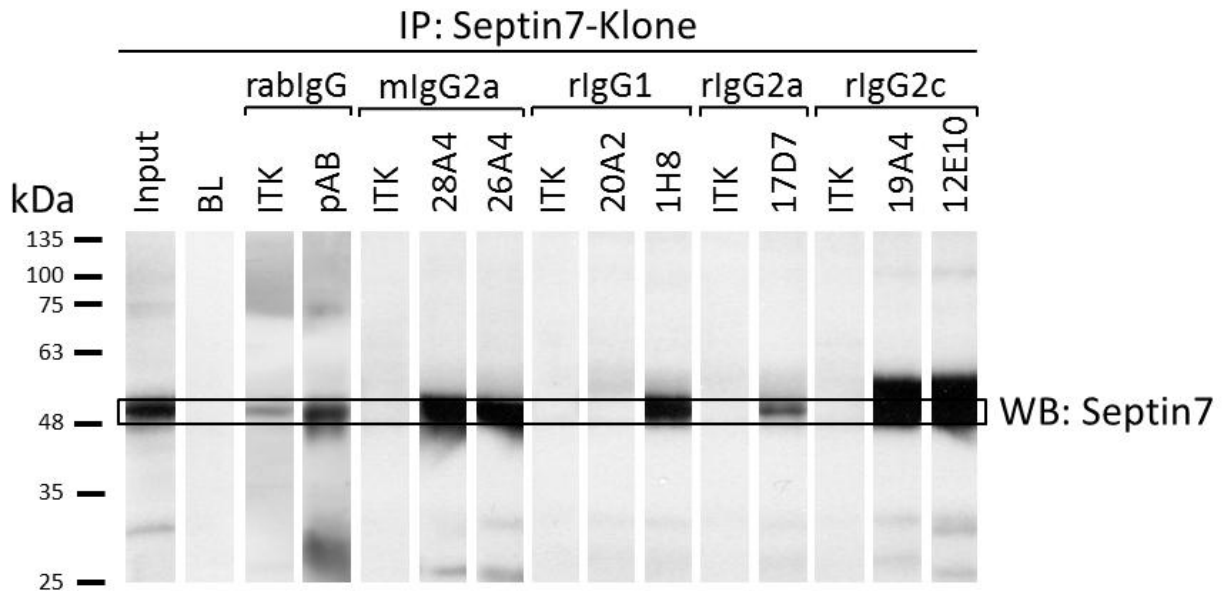
**Abb. 4.7:** Immunhistochemie zum Bindungsverhalten der stabilisierten anti-eqSeptin7-Antikörper-Klone an equine Mandibularlymphknoten.

Dargestellt sind die Differentialinterferenzkontrast-Aufnahme (DK), Positiv- (pAB) und Isotypkontrollen (ITK), sowie die stabilisierten anti-eqSeptin7-Antikörper-Klone. Gebundener primärer Antikörper stellt sich grün dar, die Zellkerne sind in blau angefärbt (DAPI). rabIgG = Isotyp Kaninchen IgG; mlgG = Isotyp Maus IgG; rlgG = Isotyp Ratte IgG; pAB = polyklonaler anti-Septin7-Antikörper aus dem Kaninchen. Drei der sieben monoklonalen Antikörperklone detektierten eqSeptin7 in der Immunzytochemie.

#### 4.2.1.5 Sechs der sieben Klone reichern Septin7 in der Immunpräzipitation an

Von Interesse war außerdem die Eignung der Klone für die Immunpräzipitation als Methode zur späteren Identifikation von Septin7-Interaktorproteinen. Deshalb wurden alle stabilisierten Klone und entsprechende Isotypkontrollen für eine Immunpräzipitation von Septin7 aus equinen PBL verwendet und die in diesem Experiment gewonnenen Präzipitate mittels Western Blot auf die erfolgte Septin7-Anreicherung untersucht (Abb. 4.8).

Im Lysat von equinen PBL, das als Proteinquelle für die Immunpräzipitation verwendet und hier als Positivkontrolle für den Western Blot aufgetragen wurde, war die Septin7-Bande auf ca. 49 kDa deutlich erkennbar (Abb. 4.8 Input). Eine ebensolche Bande zeigte sich auch im Western Blot der Präzipitate aller Klone, mit Ausnahme von 20A2 (Ratte IgG1; Abb. 4.8 20A2). Die Klone 28A4, 26A4, 1H8, 19A4 und 12E20 (Abb. 4.8, gleichnamige Streifen) zeigten sehr starke, deutliche Banden um die erwartete Höhe und konnten somit als gut geeignet für die Immunpräzipitation von Septin7 betrachtet werden. Am eindeutigsten war jedoch die Immunpräzipitation von Septin7 durch den Klon 17D7, dessen Präzipitat im Western Blot eine scharf begrenzte Bande auf der erwarteten Höhe zeigte (Abb. 4.8 17D7). Alle Isotypkontrollen der anti-eqSeptin7-Klone waren auf der Höhe von Septin7 negativ (Abb. 4.8 ITK). Lediglich die Isotypkontrolle des polyklonalen anti-Septin7-Antikörpers zeigte eine Bande, die aber schwächer war als die im Präzipitat des polyklonalen Antikörpers selbst (Abb. 4.8 rabIgG). Insgesamt können also sechs der sieben anti-Septin7-Antikörper Septin7 aus equinen PBL mittels Immunpräzipitation anreichern, davon liefert der Klon 17D7 das spezifischste Ergebnis.



**Abb. 4.8:** Anreicherung von Septin7 in Immunpräzipitaten (IP) der anti-eqSeptin7-Antikörper nach Stabilisierung aus equinen PBL.

Der Kasten markiert die Höhe von Septin7 im Western Blot (WB) (ca. 49 kDa). rablgG = Isotyp Kaninchen IgG; mlgG = Isotyp Maus IgG; rlgG = Isotyp Ratte IgG; Input = Positivkontrolle; BL = Negativkontrolle; ITK = Isotypkontrolle; pAB = polyklonaler anti-Septin7-Antikörper aus dem Kaninchen. Sechs der sieben Antikörperklone präzipitierten Septin7 aus equinen PBL.

#### 4.2.2 Fünf der acht stabilisierten Klone haben hervorragende Bindungseigenschaften an Septin7 des Pferdes

Durch die vorangegangenen Versuche konnte gezeigt werden, dass die stabilisierten anti-eqSeptin7-Antikörper-Klone unterschiedlich gut für den Nachweis von Septin7 in verschiedenen Methoden geeignet waren. Zur Zusammenfassung der Ergebnisse der in den Kapiteln 4.2.1.1 bis 4.2.1.5 dargelegten Versuche dient Tab. 4.2. Der Klon 20A2 konnte in keiner der getesteten Methoden überzeugen. Hingegen waren alle anderen Klone in mindestens einer dieser wichtigen proteinanalytischen Methoden gut oder sehr gut zum Nachweis von Septin7 geeignet.

Im Western Blot reagierte der Ratte IgG1-Klon 1H8 (Tab. 4.2, Nr. 4) am spezifischsten auf Septin7, aber auch die Klone der Isotypen Maus IgG2a und Ratte IgG2c können künftig vorbehaltlos verwendet werden. In der Durchflusszytometrie überzeugte vor allem der Klon 12E10 (Tab. 4.2, Nr. 7). Immunhisto- und immunzytochemische Studien sollten künftig bevorzugt mit einem der Klone des Isotyps Maus IgG2a, 28A4 oder 26A4 (Tab. 4.2, Nr. 1 und 2) durchgeführt werden. Sollte jedoch, beispielsweise für Doppelfärbungen, ein anderer Isotyp benötigt werden, bietet sich

dafür vor allem der Klon 1H8 (Ratte IgG1; Tab. 4.2, Nr. 4) an. Bei der Immunpräzipitation reicherten alle Klone außer 20A2 Septin7 zufriedenstellend an, wobei der Klon 17D7 für diese Methode hoch spezifisch ist.

Fünf der sieben Klone, die zur Stabilisierung ausgewählt wurden, konnten also in mindestens einer der getesteten Methoden mit sehr guten Ergebnissen überzeugen. Damit konnten erstmals monoklonale Antikörper gegen equines Septin7 charakterisiert werden, die teilweise im Western Blot eine Kreuzreaktivität mit anderen Spezies, vor allem mit dem Menschen, zeigen. Besonders erfreulich ist dabei, dass nun für jede proteinanalytisch relevante Methode mindestens ein spezifischer Antikörper mit herausragender Eignung zum Septin7-Nachweis zur Verfügung steht. Zusätzlich konnten wir außerdem einen Antikörper erzeugen, den Klon 26A4, der für jede getestete Methode herangezogen werden kann und dabei gute bis sehr gute Ergebnisse erwarten lässt.

Nr.	Klon	Isotyp	Ergebnis WB	Ergebnis FACS	Ergebnis ICC	Ergebnis IHC	Ergebnis IP
1	28A4	Maus IgG2a	++	-	+++	+++	++
2	26A4	Maus IgG2a	++	++	++	+++	++
3	20A2	Ratte IgG1	-	-	+	-	-
4	1H8	Ratte IgG1	+++	++	++	++	++
5	17D7	Ratte IgG2a	-	-	-	-	+++
6	19A4	Ratte IgG2c	++	+	+	-	++
7	12E10	Ratte IgG2c	++	+++	+	-	++

**Tab. 4.2:** Screening-Ergebnisse der stabilisierten anti-eqSeptin7-Antikörper-Klone in Western Blot (WB), Durchflusszytometrie (FACS), Immunzytochemie (ICC), Immunhistochemie (IHC) und Immunpräzipitation (IP).

- : keine Bindung von Septin7.

+ : mäßige Bindung von Septin7.

++ : gute Bindung von Septin7.

+++ : sehr gute Bindung von Septin7.

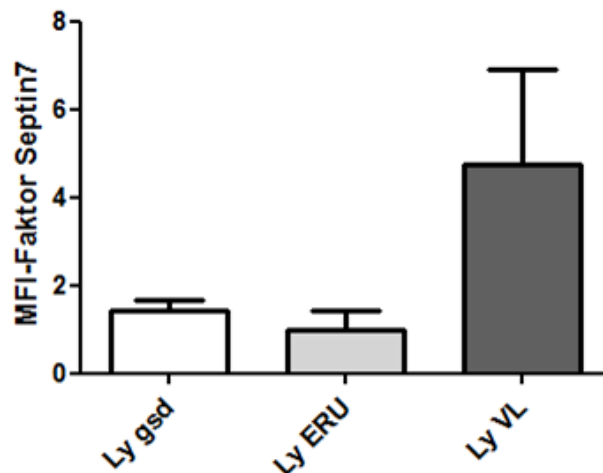
Fünf der sieben Klone detektierten Septin7 in mindestens einer Methode sehr gut.



### 4.3 Septin7 ist zwischen Blut- und intraokulären Lymphozyten bei der ERU differentiell reguliert

#### 4.3.1 Die Septin7-Expression ist in VL erhöht

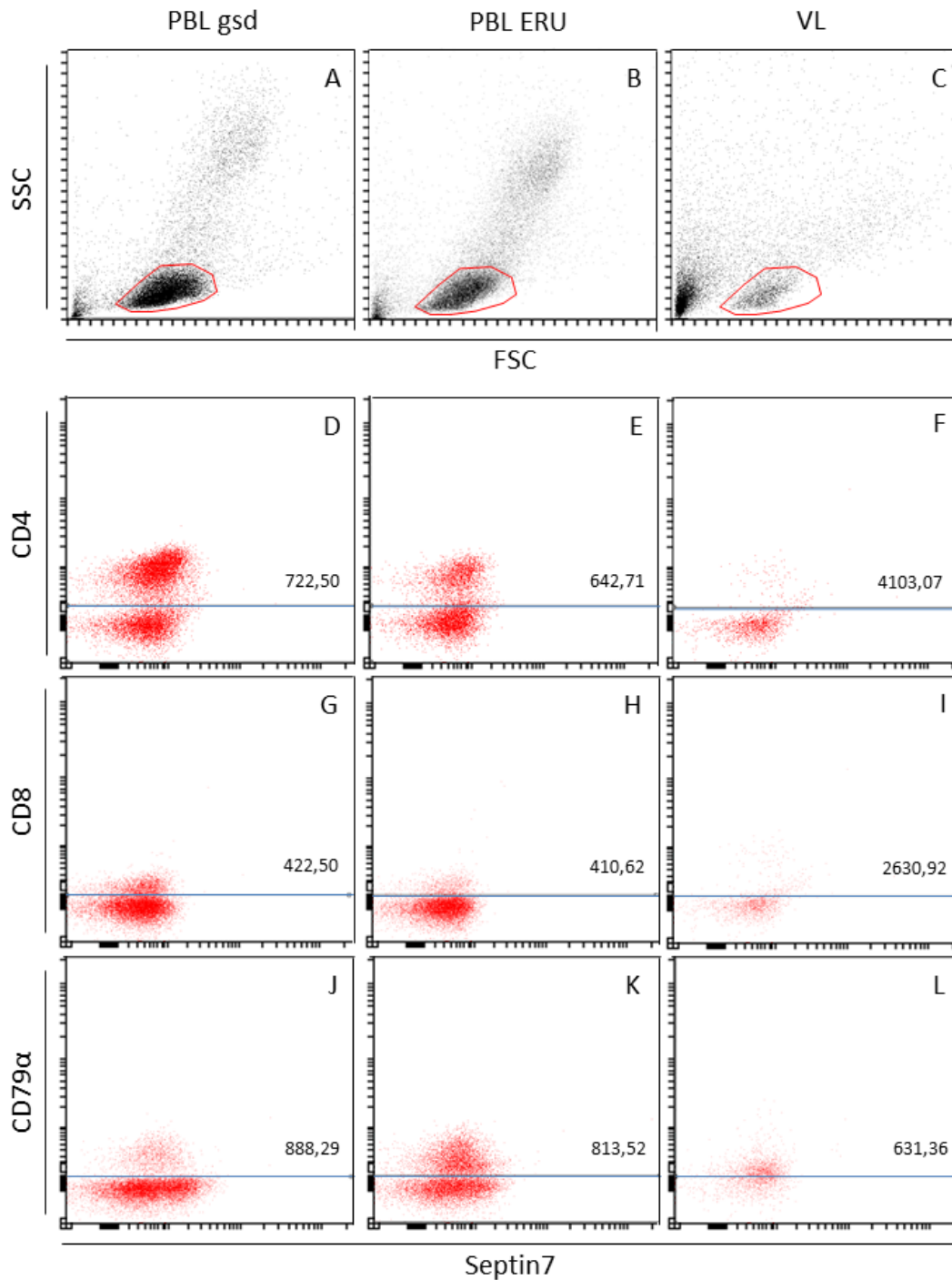
Wie vorherige Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten, ist Septin7 in peripheren Lymphozyten von an ERU erkrankten Pferden geringer exprimiert als bei augengesunden Kontrollen (Degroote et al. 2014). Die Regulation von Septin7 in Zellen, die während der wiederkehrenden Entzündungsschübe bei der ERU über die BRS ins Auge transmigrieren (VL), im Vergleich zu peripheren Lymphozyten von ERU-Patienten sollte im Zuge dieser Arbeit näher untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde eine durchflusszytometrische Analyse von peripheren Lymphozyten und VL ERU-kranker Tiere durchgeführt. Die bereits aus der Vorarbeit bekannte Expressionsminderung in peripheren Lymphozyten der ERU-Tiere im Vergleich zu denen gesunder Pferde (Degroote et al. 2014) bestätigte sich in diesem Versuch (Abb. 4.9, vgl. weiße und hellgraue Säule). In intraokulären Lymphozyten stieg Septin7 überraschenderweise wiederum stark an und wurde 4,7-mal so stark exprimiert wie in den peripheren Lymphozyten derselben Tiere (Abb. 4.9, vgl. hellgraue und dunkelgraue Säule).



**Abb. 4.9:** Änderung der Expressionsstärke von Septin7 in peripheren Lymphozyten gesunder Pferde (Ly gsd; weiße Säule; n = 5) und intraokulären Lymphozyten von ERU-Patienten (Ly VL, dunkelgrau; n = 5) gegenüber peripheren Lymphozyten der gleichen ERU-Patienten (Ly ERU; hellgraue Säule; n = 5). Der Mittelwert der mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) von Septin7 der Ly ERU wurde gleich 1 gesetzt ( $\pm 0,4$ ). Im Vergleich dazu stieg die MFI in Ly VL der gleichen Tiere um den Faktor  $4,7 \pm 2,1$ . Als Positivkontrolle untersuchte Ly gsd exprimierten  $1,4$ -mal ( $\pm 0,2$ ) so viel Septin7 wie Ly ERU. Diese Veränderungen waren nicht statistisch signifikant.



Interessant war nach der Entdeckung dieser deutlichen Regulation auf Lymphozyten aus VL, inwieweit sich diese auf Expressionsänderungen in den einzelnen Subpopulationen von peripheren und intraokulären Lymphozyten zurückführen ließen. Zum Zweck, dazu Informationen zu erhalten, wurden diese Subpopulationen in peripheren und intraokulären Lymphozyten eines weiteren ERU-Pferdes durchflusszytometrisch auf ihre Septin7-Expression untersucht. Dabei zeigten sich deutliche Veränderungen der Septin7-Expressionen zwischen diesen Zellen. So sank die Septin7-Expression in intraokulären B-Zellen auf 78% des Wertes der peripheren B-Zellen des gleichen Tieres (vgl. Abb. 4.10 L und K), während sie in beiden T-Zell-Subpopulationen, Cluster of Differentiation (CD) 4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen, in VL jeweils deutlich um den Faktor 6,4 anstieg (vgl. Abb. 4.10 E und F, H und I). Die Expression von Septin7 in intraokulären Lymphozyten überstieg auch die in peripheren Lymphozyten des gesunden Tieres bei weitem.

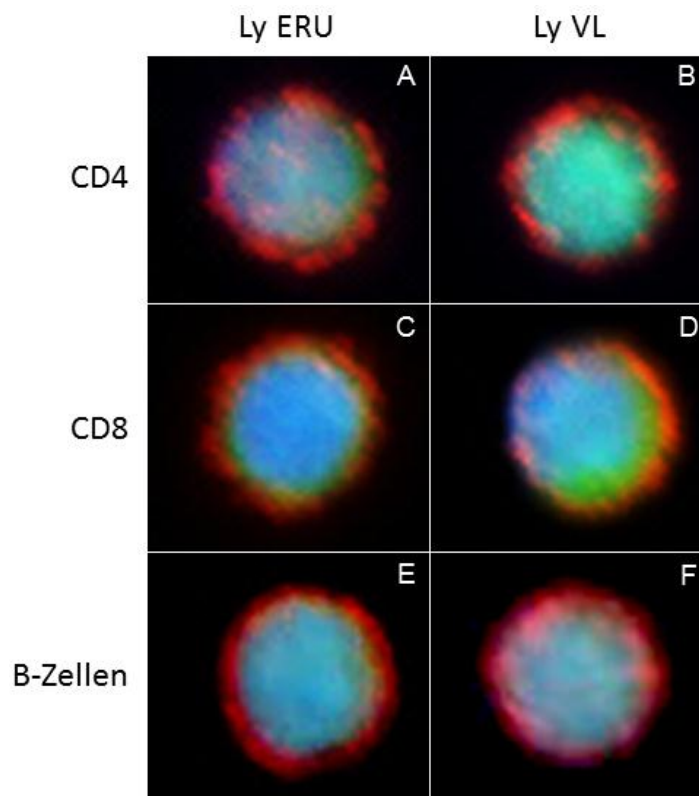


**Abb. 4.10:** Veränderung der Septin7-Expression auf CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> und B-Zellen (CD79α<sup>+</sup>) zwischen Lymphozyten aus gesunden PBL (PBL gsd) PBL eines ERU-Tieres (PBL ERU) und VL des ERU-Tieres (VL).

Im obersten Panel (A-C) ist die zur Analyse gegatete Lymphozytenpopulation gezeigt. Die folgenden drei Paneele sind Darstellungen der Doppelfärbungen von Septin7 und dem entsprechenden Populationsmarker (D-F: CD4; G-I: CD8; J-L: CD79α) und beziehen sich auf die Zellen innerhalb der roten Markierung in A, B oder C. Pro Panel sind jeweils Lymphozyten des gesunden Tieres (A, D, G und J), des an ERU erkrankten Tieres (B, E, H und K) und VL desselben an ERU erkrankten Tieres (C, F, I und L) vergleichend angeordnet. In A-C bezeichnet die Y-Achse den Sideward Scatter (SSC), die X-Achse den Forward Scatter (FSC). In D-L ist auf der Y-Achse die Expression von CD4 (T-

Helferzellen), CD8 (zytotoxische T-Zellen) und CD79 $\alpha$  (B-Zellen), auf der X-Achse die Expression von Septin7 aufgetragen. Alle dargestellten Zellen sind positiv für Septin7. Die blaue Linie bezeichnet die Grenze zwischen für den entsprechenden Marker (CD4, CD8, CD79 $\alpha$ ) positiven und negativen Zellen. Zusätzlich befindet sich in jeder Teilabbildung der Wert der MFI von Septin7 für die Marker-positive Population. Septin7 ist in CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> VL jeweils 6,4-mal so stark, in B-Zellen hingegen schwächer exprimiert als in den entsprechenden Subpopulationen peripherer Lymphozyten des ERU-Tieres.

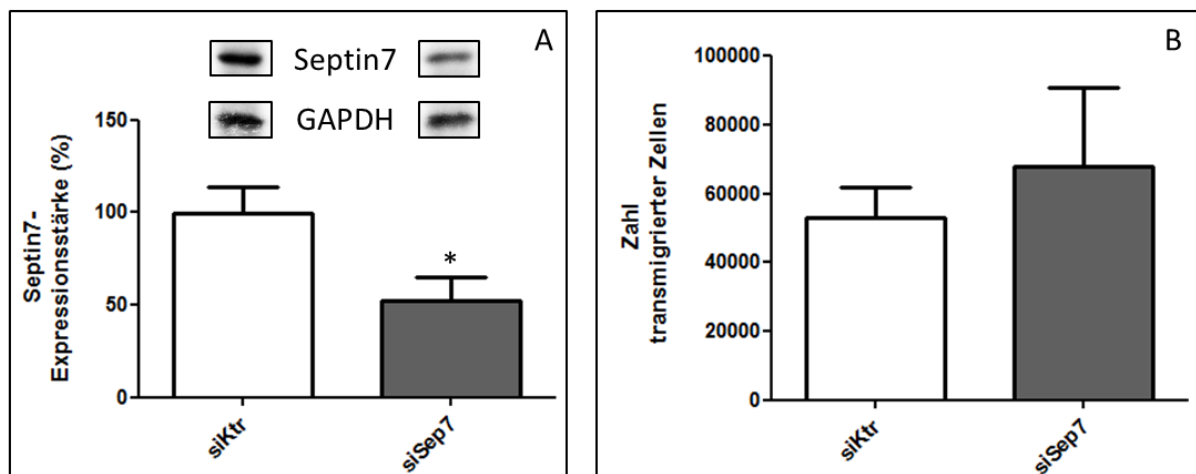
Die differentielle Regulation zwischen peripheren und intraokulären Lymphozyten bei der ERU wurde mittels Immunzytochemie an diesen Zellen eines weiteren ERU-Patienten bestätigt (Abb. 4.11). Auch dieser Versuch ergab eine etwa gleichbleibende Expression von Septin7 in B-Zellen aus VL (vgl. Abb. 4.11 E und F), während Septin7 in CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> VL deutlich stärker exprimiert war als in den entsprechenden Subpopulationen der peripheren Lymphozyten desselben ERU-Tieres (vgl. Abb. 4.11 A und B, C und D).



**Abb. 4.11:** Expressionsmuster von Septin7 auf CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> und B-Zell-Subpopulationen von peripheren (Ly ERU; A, C, E) und intraokulären Lymphozyten (Ly VL; B, D, F) von an ERU erkrankten Pferden in der Immunzytochemie. In grün ist jeweils Septin7 zu sehen, in rot ist der entsprechende Populationsmarker (A-B: CD4; C-D: CD8; E-F: IgM) dargestellt. Die Zellkerne sind blau (DAPI) angefärbt. Die Überlagerung des Zellkerns mit Septin7 stellt sich hellblau dar. Die Septin7-Expression steigt in CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> VL an und bleibt zwischen peripheren und intraokulären B-Zellen unverändert.

#### 4.3.2 Septin7-defiziente Zellen migrieren vermehrt durch equines RPE

Die Transmigration von Leukozyten über immunologische Barrieren stellt ein Schlüsselereignis bei der Pathogenese der ERU dar (Degroote et al. 2013). In murinen T-Zellklonen konnte nachgewiesen werden, dass die Transmigrationsrate Septin7-defizienter Zellen gegenüber der von Kontrollzellen signifikant erhöht ist (Tooley et al. 2009). Zu einer möglichen Bedeutung der differentiellen Regulation von Septin7 bei der ERU für die Transmigration der Effektorzellen wurden bisher jedoch keine Studien durchgeführt. Deshalb wurde für den nächsten Versuch als erstes mittels spezifischer small interfering (si) RNA die Septin7-Expression in equinen PBL signifikant ( $p < 0,05$ ) um 50% verringert (Silencing) (Abb. 4.12 A). Die so Septin7-gesilenceten Zellen wurden in einem Transmigrationsassay über equine retinale Pigmentepithel (RPE)-Zellen auf ihre Transmigrationseigenschaften untersucht. Die Zahl der gewanderten PBL nach drei Stunden betrug für die mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen  $53.000 \pm 9.000$ , für die Septin7-gesilenceten Zellen  $68.000 \pm 23.000$ . Es zeigte sich also, dass die Septin7-defizienten PBL eine durchschnittlich um 28% gesteigerte Transmigrationsrate gegenüber den mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen aufwiesen (Abb. 4.12 B). Die Verringerung der Septin7-Expression in equinen PBL verbesserte in diesem Versuch somit deren Fähigkeit, immunologische Barrieren, wie das RPE, zu überwinden.



**Abb. 4.12:** Einfluss des Silencings von Septin7 auf die Transmigrationsfähigkeit equiner PBL.

A: Verifizierung der reduzierten Septin7-Expression Septin7-gesilenceter PBL im Western Blot ( $n = 4$ ). Die Septin7-Expression war nach Silencing (siSep7; graue Säule) verglichen mit Kontroll-gesilenceten PBL (siKtr; weiße Säule) signifikant ( $p = 0,02$ ) auf 52% ( $\pm 13\%$ ) reduziert ( $n = 4$ ).

B: Zahl transmigrierter Kontroll- (siKtr; weiße Säule) und Septin7-gesilenceter PBL (siSep7; graue Säule) ( $n = 4$ ). PBL mit verringerter Septin7-Expression durch Septin7-Silencing (siehe A) transmigrieren 28% stärker (graue Säule) als mit Kontroll-siRNA behandelte PBL (weiße Säule).

## **4.4 Identifikation von Septin7-Interaktoren**

Der vorangegangene Versuch zur Transmigrationsrate Septin7-defizienter Zellen zeigte, dass die Expressionsstärke von Septin7 Einfluss auf das Wanderungsverhalten von equinen PBL über die Blut-Retina-Schranke und damit auf die Entwicklung der Symptomatik der ERU nehmen könnte (Abb. 4.12). Die differentielle Regulation von Septin7, sowohl zwischen gesunden peripheren Lymphozyten und solchen von an ERU erkrankten Pferden (Degroote et al. 2014) als auch zwischen peripheren und intraokulären Lymphozyten ein und desselben ERU-Patienten (siehe Kap. 4.3.1), deutete auf eine mögliche Schlüsselrolle dieses Proteins in der Pathogenese der ERU hin.

Als zytoskelettale Proteine (Dolat et al. 2014) stehen Septine funktionell mit einer Vielzahl weiterer Proteine in Verbindung (Rosenbaum et al. 2009). Durch die Suche nach Interaktoren von Septin7 sollten also weitere Informationen über das Zusammenspiel von Septin7 mit anderen, möglicherweise für die Entstehung der ERU relevanten Proteinen gewonnen werden, um dadurch die für die gesteigerten Transmigrationszahlen nach Septin7-Silencing (Abb. 4.12 B) verantwortlichen Mechanismen aufzuklären.

### **4.4.1 Mittels Immunpräzipitation und Massenspektrometrie konnten potentielle Septin7-Interaktoren bestimmt werden**

Frühere Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass sich die Analyse massenspektrometrisch generierter Daten hervorragend eignet, um die Proteinzusammensetzung zweier Proben vergleichend zu untersuchen und beispielsweise zwischen zwei Konditionen differentiell regulierte (Szober et al. 2012, Uhl et al. 2014) oder technisch speziell angereicherte Proteine (Degroote et al. 2013) ausfindig zu machen.

Da unser Augenmerk in dieser Arbeit insbesondere auf den mit Septin7 in engem Kontakt stehenden Proteinen des Lymphozytenproteoms lag, führten wir eine Immunpräzipitation von Septin7 aus mittels Dichtegradientenzentrifugation präparierten equinen PBL durch. Proteine, die im als Proteinquelle verwendeten Zelllysate in strukturellem Zusammenhang mit Septin7 standen, wurden so mit diesem gemeinsam angereichert. Die massenspektrometrische Untersuchung des Präzipitats ergab eine 1189-fache Anreicherung von Septin7 im Eluat des monoklonalen anti-

eqSeptin7-Antikörpers (Tab. 4.3, Nr. 13), was das Gelingen dieses Experiments und damit auch erneut die erfolgreiche Herstellung von Antikörpern, die für die Immunpräzipitation von Septin7 des Pferdes geeignet sind, untermauerte. Weitere 47 Proteine, die nie zuvor als Septin7-Interaktoren beim Pferd beschrieben worden waren, wurden mit Septin7 ko-präzipitiert und waren im Präzipitat des anti-Septin7-Antikörpers mindestens 25-fach stärker angereichert als in dem des Kontrollantikörpers (Tab. 4.3).

Nr. <sup>A</sup>	Proteinname <sup>B</sup>	Accession Nummer <sup>C</sup>	Ratio <sup>D</sup>
1	Actin related protein 2/3 complex, subunit 2	ENSECAP00000009522	114376
2	Histone H2A	ENSECAP00000001117	3346
3	Cell division cycle 42	ENSECAP00000003324	2529
4	Capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 1	ENSECAP00000014750	2355
5	Myosin, light chain 6, alkali, smooth muscle and non-muscle	ENSECAP00000016002	2283
6	Actin, cytoplasmic 2	ENSECAP00000016124	1710
7	Septin 6	ENSECAP00000021088	1602
8	Histone cluster 1, H2bj	ENSECAP00000001004	1546
9	Vimentin	ENSECAP00000004638	1365
10	Fibrinogen alpha chain	ENSECAP00000008007	1348
11	C-reactive protein, pentraxin-related	ENSECAP00000022415	1343
12	Actinin, alpha 1	ENSECAP00000017987	1331
13	Septin 7	ENSECAP00000020433	1189
14	Dedicator of cytokinesis 8	ENSECAP00000010583	1063
15	Myosin IG	ENSECAP00000016084	930
16	Flotillin 2	ENSECAP00000010141	776
17	Protein S100-A8	ENSECAP00000007199	750
18	Tropomodulin 3 (ubiquitous)	ENSECAP00000018986	686
19	Cathepsin G	ENSECAP00000003203	673
20	Septin 2	ENSECAP00000015383	622
21	Stomatin	ENSECAP00000010841	560
22	S100 calcium binding protein A12	ENSECAP00000007652	488
23	Histone H4	ENSECAP00000001598	482
24	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	ENSECAP00000020855	458
25	Tropomyosin 4	ENSECAP00000019820	374
26	S100 calcium binding protein A9	ENSECAP00000008026	316
27	Tropomyosin 3	ENSECAP00000009031	306
28	Eosinophil peroxidase	ENSECAP00000015423	233
29	Galectin-9B	ENSECAP00000020301	208
30	Myeloperoxidase	ENSECAP00000005617	177
31	Tubulin, beta class I	ENSECAP00000017687	147
32	Myosin, heavy chain 9, non-muscle	ENSECAP00000019288	142
33	Pyruvate kinase, muscle	ENSECAP00000006544	134

34	Granulin	ENSECAP00000016040	92
35	Gelsolin	ENSECAP00000017333	84
36	Septin 11	ENSECAP00000005055	76
37	Rho GTPase activating protein 4	ENSECAP00000021106	66
38	Capping protein (actin filament) muscle Z-line, beta	ENSECAP00000007282	64
39	Myosin IF	ENSECAP00000014940	57
40	Fibrinogen beta chain	ENSECAP00000008406	48
41	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1	ENSECAP00000012462	47
42	Laktotransferrin	ENSECAP00000019516	46
43	Keratin 16	ENSECAP00000004544	43
44	Bactericidal/permeability-increasing protein	ENSECAP00000019804	43
45	Myosin XVIII A	ENSECAP00000018749	41
46	Keratin 5	ENSECAP00000018010	33
47	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box helicase 3, X-linked	ENSECAP00000008443	31
48	Profilin	ENSECAP00000001190	25

**Tab. 4.3:** Massenspektrometrisch aus dem Septin7-Immunpräzipitat identifizierte Proteine.

A: Fortlaufende Nummer; B: Name des identifizierten Proteins; C: Identifikationsnummer des Proteins aus Ensembl-Datenbank ([http://www.ensembl.org/Equus\\_caballus/Info/Index](http://www.ensembl.org/Equus_caballus/Info/Index)); D: Ratio (Verhältnis der Expression des Proteins im Präzipitat des anti-Septin7-Antikörpers zu der im Präzipitat der Isotypkontrolle). 47 Proteine wurden bei der Immunpräzipitation von Septin7 aus equinen PBL koangereichert.

#### 4.4.2 Vimentin und Laktotransferrin können als Interaktoren von Septin 7 des Pferdes verifiziert werden

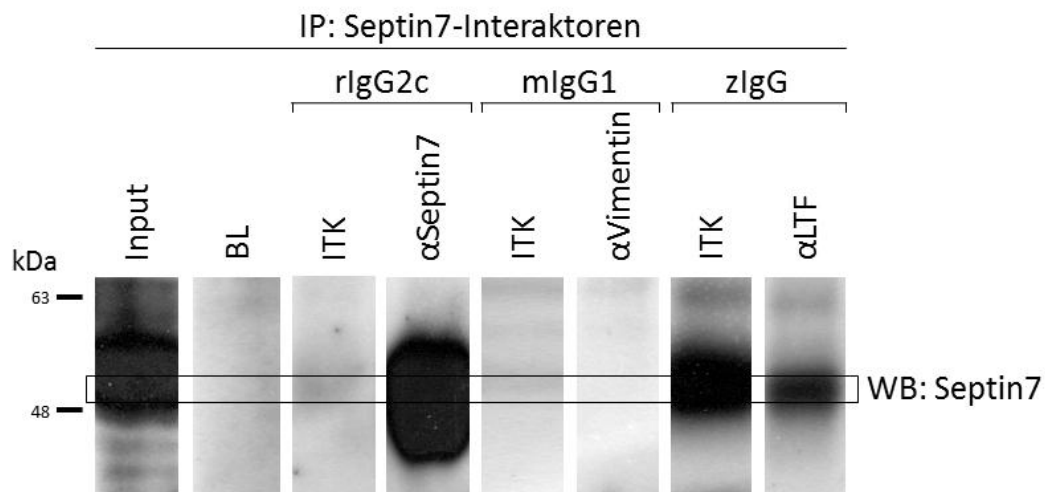
Aus dieser Vielzahl von Proteinen wurden zwei ausgewählt, die funktionell von besonderem Interesse waren. Eines davon, Vimentin (Tab 4.3 Nr. 9), ist ein Protein zytoskelettaler Intermediärfilamente (Dave and Bayless 2014), das die Flexibilität des Zytoskeletts beeinflusst (David et al. 2014), was für die Transmigration von Leukozyten über immunologische Barrieren hoch interessant ist. Das Protein Laktotransferrin (Tab 4.3 Nr. 42) hat umfassende Funktionen beim angeborenen und erworbenen Immunsystem (de la Rosa et al. 2008). So begünstigt es beispielsweise die Differenzierung von CD4<sup>+</sup> Zellen (Dhennin-Duthille et al. 2000) und nimmt damit auch Einfluss auf die Ausbildung der T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>17-Antwort unter proinflammatorischen Bedingungen (Hwang et al. 2014).

Als Verifikationsexperiment für die ausgewählten Kandidaten diente eine zweite Immunpräzipitation, bei der zur wissenschaftlichen Bestätigung der Interaktion zwischen Septin7 und den Kandidaten Antikörper gegen die potentiellen Interaktorproteine eingesetzt wurden. Ein Western Blot von den Präzipitaten dieser

Antikörper wurde anschließend mit einem anti-eqSeptin7-Antikörper-Klon inkubiert um nun umgekehrt auf das Vorhandensein von Septin7 in diesen Proben zu untersuchen (Rückwärts-IP).

Das Präzipitat des Proteins Laktotransferrin, welches mit Septin7 46-fach koangereichert war (Tab 4.3 Nr. 42), enthielt deutlich nachweisbar Septin7 (Abb. 4.13  $\alpha$ LTF). Allerdings befand sich auch im Eluat der entsprechenden Isotypkontrolle Septin7 in großen Mengen (Abb. 4.13 zIgG ITK), so dass es zur endgültigen Bestätigung weiterer Versuche bedarf.

Im Präzipitat des anti-Vimentin-Antikörpers gelang der Nachweis von Septin7 nicht (Abb. 4.13  $\alpha$ Vimentin).



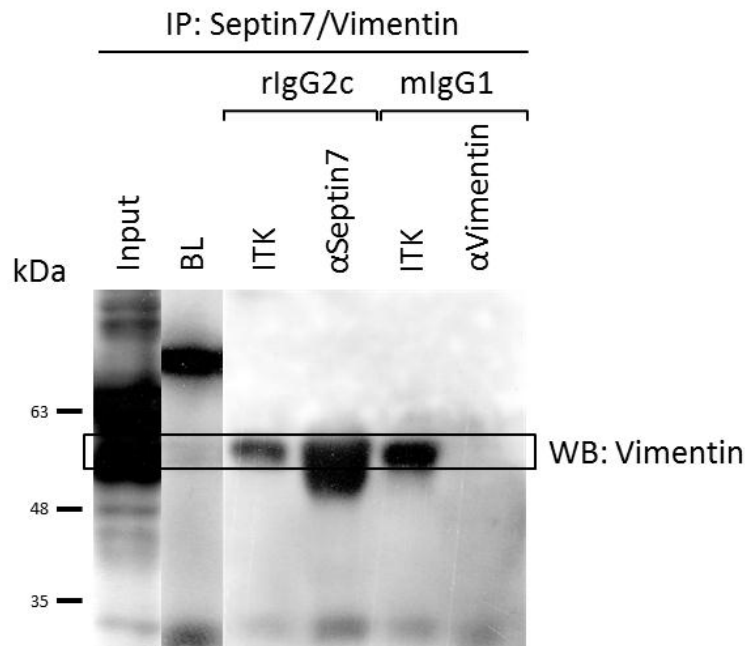
**Abb. 4.13:** Anreicherung von Septin7 in den Immunpräzipitaten (IP) des anti ( $\alpha$ )-Vimentin- und des  $\alpha$ -Laktotransferrin (LTF)-Antikörpers. Der Kasten markiert die Höhe von Septin7 im Western Blot (WB) (ca. 49 kDa).

rIgG = Isotyp Ratte IgG; mIgG = Isotyp Maus IgG; zIgG = Isotyp Ziege IgG; Input = Positivkontrolle; BL = Negativkontrolle; ITK = Isotypkontrolle. Die Interaktion von Septin7 mit LTF und Vimentin kann nicht zweifelsfrei bestätigt werden.

Da die Rückwärts-IP von Vimentin ohne Erfolg verlaufen war, wurde die Interaktion von Septin7 und Vimentin mittels eines mit anti-Vimentin-Antikörper inkubierten Western Blots der Präzipitate untersucht (Abb. 4.14). Hier zeigte sich, dass der Misserfolg der Rückwärts-IP mit großer Wahrscheinlichkeit auf die fehlende Eignung des anti-Vimentin-Antikörpers für die Immunpräzipitation von Vimentin zurückzuführen gewesen war (Abb 4.14  $\alpha$ Vimentin), da trotz Nachweis des Proteins in der Proteinquelle (Abb. 4.14 Input) keine Detektion im anti-Vimentin-Antikörper-Präzipitat erfolgte (Abb. 4.14  $\alpha$ Vimentin). Vimentin fand sich jedoch im Präzipitat des anti-Septin7-Antikörpers (Abb. 4.14  $\alpha$ Septin7), wodurch die Interaktion zwischen



Septin7 und Vimentin neben der Massenspektrometrie (siehe Tab. 4.3 Nr. 9) noch mittels einer weiteren Methode bestätigt werden konnte und somit als wahrscheinlich galt.



**Abb. 4.14:** Anreicherung von Vimentin in den Immunpräzipitaten (IP) des  $\alpha$ -Septin7- und des  $\alpha$ -Vimentin-Antikörpers.

Der Kasten markiert die Höhe von Vimentin im Western Blot (WB) (58 kDa).

mlgG = Isotyp Maus IgG; rlgG = Isotyp Ratte IgG; Input = Positivkontrolle; BL = Negativkontrolle, ITK = Isotypkontrolle. Septin7 interagiert höchst wahrscheinlich mit Vimentin. Der anti-Vimentin-Antikörper ist für die Immunpräzipitation nicht geeignet.

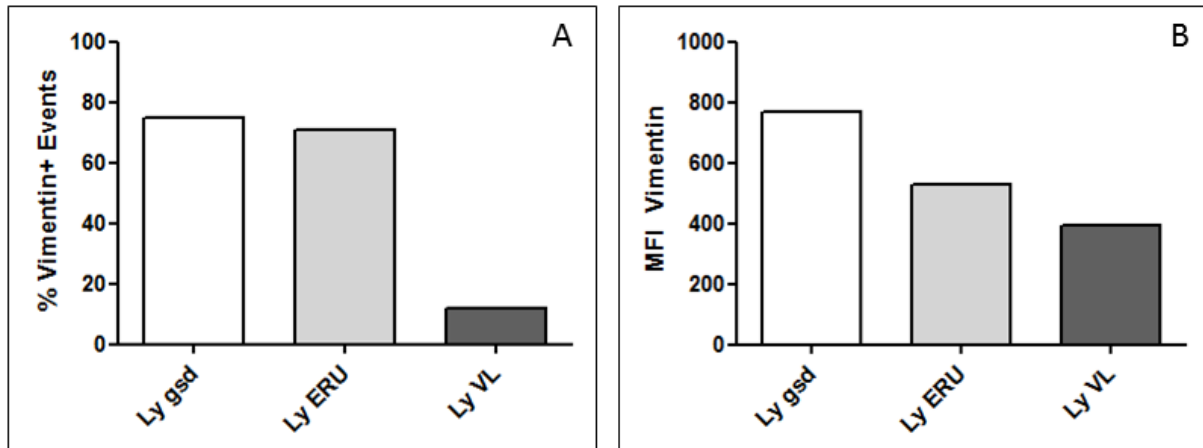
#### 4.4.3 Die bestätigten Septin7-Interaktoren sind auf peripheren und intraokulären Lymphozyten bei der ERU differentiell reguliert

Im Folgenden wurden nun durchflusszytometrische Untersuchungen zur differentiellen Regulation von Vimentin und Laktotransferrin zwischen peripheren und intraokulären Lymphozyten von ERU-Pferden sowie peripheren Blutlymphozyten gesunder Spendertiere durchgeführt, um Hinweise auf eine Beteiligung der beiden Septin7-Interaktoren an Regulationsmechanismen bei der Entstehung der ERU zu erhalten.

##### 4.4.3.1 Vimentin ist in VL niedriger exprimiert als in peripheren Lymphozyten

Vimentin war in VL des ERU-Patienten auf weitaus weniger Zellen exprimiert (12%) als in seinen peripheren Lymphozyten und Lymphozyten des gesunden Kontrolltieres (Abb. 4.15 A). Auch die mittlere Expression pro Zelle sank deutlich, jedoch weniger

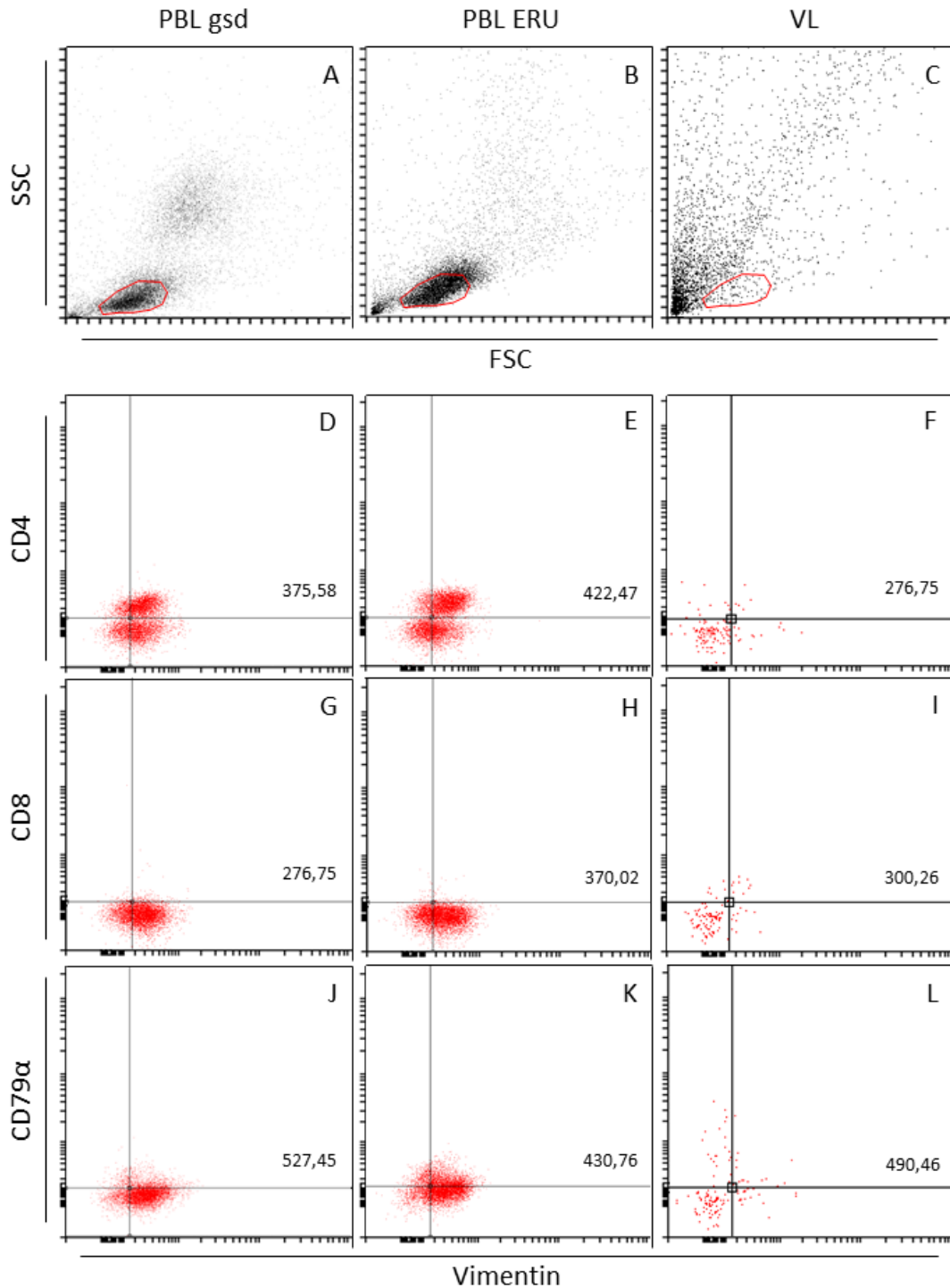
stark. Die Vimentin-Expression in peripheren Vimentin<sup>+</sup> Lymphozyten des ERU-Patienten sank auf 69% des Wertes bei den entsprechenden Zellen des gesunden Tieres (vgl. Abb. 4.15 B weiße und hellgraue Säule). In vitrealen Lymphozyten sank die Expression weiter und belief sich nur noch auf 51% der Expressionsstärke in gesunden peripheren Lymphozyten (vgl. Abb. 4.15 B weiße und dunkelgraue Säule).



**Abb. 4.15:** Anteil Vimentin-positiver Zellen an Gesamtlmphozyten (A) und Expressionsstärke von Vimentin in Vimentin<sup>+</sup> peripheren Lymphozyten eines gesunden (weiße Säule) und eines an ERU-erkrankten Tieres (hellgraue Säule) sowie in intraokulären Lymphozyten desselben ERU-kranken Tieres (dunkelgraue Säule) (B). A: 75% der peripheren Lymphozyten des gesunden Tieres exprimieren Vimentin, 71% der peripheren Lymphozyten des an ERU erkrankten Tieres und 12% der intraokulären Lymphozyten des kranken Tieres. B: Die Expressionsstärke sinkt in Lymphozyten bei ERU gegenüber den gesunden PBL auf 69% und in intraokulären Lymphozyten weiter auf 51% des Wertes gesunder Zellen.

Zur genaueren Charakterisierung dieser Expressionsminderung in ERU-Lymphozyten wurde eine weitere durchflusszytometrische Analyse durchgeführt. Die Expression von Vimentin wurde dabei in Subpopulationen von peripheren Lymphozyten gesunder und ERU-kranker Pferde sowie in intraokulären Lymphozyten bei der ERU untersucht (Abb. 4.16). Dabei wurde deutlich, dass die Senkung der Vimentin-Gesamtexpression in ERU-Lymphozyten verglichen mit denen gesunder Pferde vor allem die B-Zell-Subpopulation betraf (vgl. Abb. 4.16 J und K). Hingegen war die weiter reduzierte Gesamtexpression in intraokulären bezogen auf periphere Lymphozyten desselben ERU-Tieres vor allem auf die starke Absenkung in CD4<sup>+</sup> Zellen zurückzuführen ist (vgl. Abb. 4.16 E und F).

Die differentielle Regulation von Vimentin zwischen peripheren und intraokulären Lymphozyten bei der ERU vollzieht sich also vorrangig auf der T-Helferzell-Subpopulation.



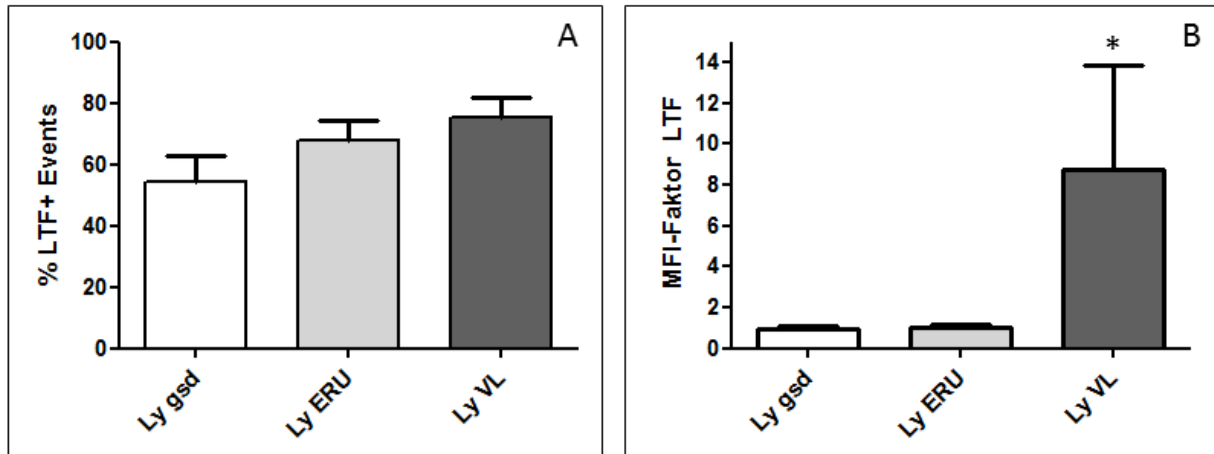
**Abb. 4.16:** Veränderung der Vimentin-Expression auf CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> und B-Zellen (CD79α<sup>+</sup>) zwischen Lymphozyten aus gesunden PBL (PBL gsd), PBL eines ERU-Tieres (PBL ERU) und VL des ERU-Tieres (VL).

Im obersten Panel (A-C) ist die zur Analyse gegatete Lymphozytenpopulation gezeigt. Die folgenden drei Panele sind Darstellungen der Doppelfärbungen von Vimentin mit einem Populationsmarker (D-F: CD4; G-I: CD8; J-L: CD79α) und beziehen sich auf die Zellen innerhalb der roten Markierung in A, B oder C. Pro Panel sind jeweils Lymphozyten des gesunden Tieres (A, D, G und J), des an ERU erkrankten Tieres (B, E, H und K) und VL desselben an ERU erkrankten Tieres (C, F, I und L) vergleichend angeordnet. In A-C bezeichnet die Y-Achse den Sideward Scatter (SSC), die X-Achse

den Forward Scatter (FSC). In D-L ist auf der Y-Achse die Expression von CD4 (T-Helferzellen), CD8 (zytotoxische T-Zellen) oder CD79 $\alpha$  (B-Zellen), auf der X-Achse die Expression von Vimentin aufgetragen. Im oberen linken Quadranten finden sich die einfach Marker-positiven, im unteren rechten die einfach Vimentin-positiven Events. Der untere linke Quadrant enthält die negativen Events und der obere rechte die für beide entsprechenden Proteine positiven. Zusätzlich befindet sich in jedem oberen rechten Quadranten der Wert der mittleren Fluoreszenzintensität von Vimentin für die Marker-positive Population. Vimentin ist in CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> VL jeweils weniger stark, in den intraokulären B-Zellen hingegen stärker exprimiert als in peripheren Lymphozyten des ERU-Tieres.

#### **4.4.3.1 Die Laktotransferrin-Expression steigt in VL gegenüber peripheren Lymphozyten**

Auch die Laktotransferrin-Expression auf Lymphozyten aus dem Blut von gesunden und an ERU-erkrankten Pferden sowie intraokulärer Lymphozyten bei der ERU wurde durchflusszytometrisch untersucht. Der Anteil der Laktotransferrin-exprimierenden Zellen an der Gesamtlymphozytenzahl stieg von durchschnittlich 54% ( $\pm 9\%$ ) in peripheren Lymphozyten gesunder Tiere auf 68% ( $\pm 4\%$ ) bei denen der ERU-Pferde (vgl. Abb. 4.17 A, weiße und hellgraue Säule). Auf intraokulären Lymphozyten der ERU-Tiere erfolgte ein weiterer Anstieg, von diesen exprimierten 75% ( $\pm 7\%$ ) Laktotransferrin (vgl. Abb. 4.17 A, hell- und dunkelgraue Säule). Noch deutlicher war die Expressionssteigerung allerdings bei Betrachtung der mittleren Laktotransferrin-Expression pro Zelle. Hierbei kam es zwischen peripheren Lymphozyten gesunder und erkrankter Tiere zu keiner nennenswerten Regulation (vgl. Abb. 4.17 B, weiße und hellgraue Säule), während die intraokulären Lymphozyten erkrankter Pferde Laktotransferrin signifikant ( $p \leq 0,05$ ) um den Faktor 8,8 ( $\pm 5,1$ ) höher exprimierten als die peripheren Blutlymphozyten der gleichen Tiere (vgl. Abb. 4.18 B, hell- und dunkelgraue Säule).

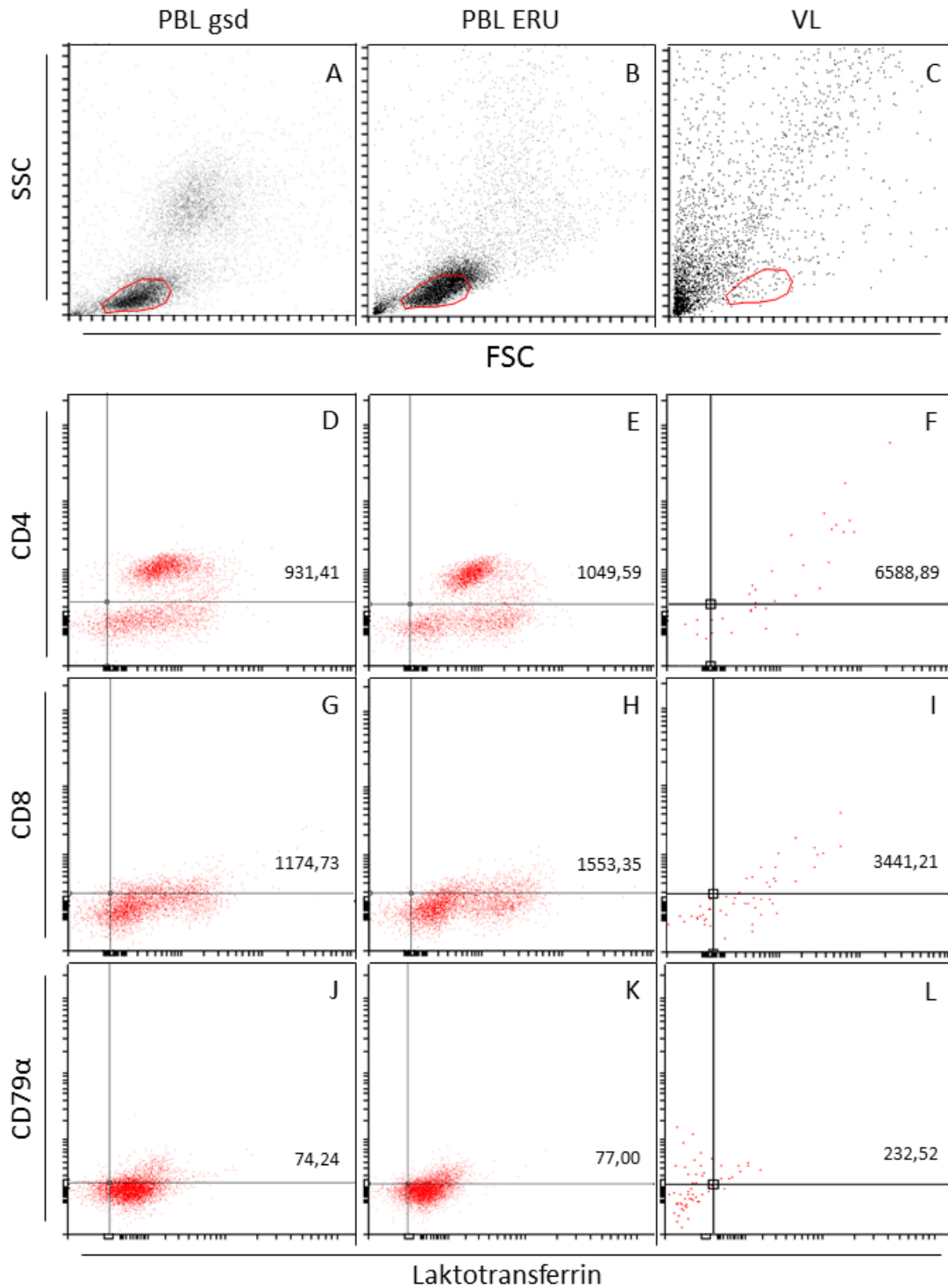


**Abb. 4.17:** Anteil Laktotransferrin (LTF)-positiver Zellen an Gesamtlymphozyten (A) und Expressionsstärke von LTF (B) in LTF<sup>+</sup> peripheren Lymphozyten von gesunden (Ly gsd; n = 10; weiße Säule) und ERU-kranken Tieren (Ly ERU; n = 23; hellgraue Säule) sowie intraokulärer Lymphozyten einiger derselben ERU-kranken Tiere (Ly VL; n = 11; dunkelgraue Säule).

A: 54 ± 9% der Ly gsd exprimieren LTF, 68 ± 6% der Ly ERU und 75 ± 7% der Ly VL.

B: Die Expressionsstärke verändert sich in Ly ERU gegenüber den Ly gsd nicht (Ly gsd = 96 ± 16% von Ly ERU) und steigt in Ly VL gegenüber Ly ERU signifikant ( $p = 0,03$ ) um den Faktor 8,8 (± 5,1) an. Lymphozyten in VL exprimierten LTF signifikant stärker als periphere Lymphozyten.

Auch diese Veränderungen wurden in einer weiteren durchflusszytometrischen Analyse bezüglich ihrer Verteilung auf die Lymphozyten-Subpopulationen untersucht. Die erhöhte Gesamtexpression von Laktotransferrin in intraokulären Lymphozyten ergab sich aus einer Expressionssteigerung in allen drei Lymphozyten-Subpopulationen, wobei auch hier die deutlichste Regulation die CD4<sup>+</sup> Zellen betraf. Die Unterschiede in der Fluoreszenzintensität von Laktotransferrin zwischen peripheren Lymphozyten des gesunden und des erkrankten Pferdes waren in allen Subpopulationen dieser Zellen, wie auch bereits bei der Gesamtexpression zu sehen gewesen war (Abb. 4.17), gering (vgl. Abb. 4.18 Panel Ly gsd und Panel Ly ERU). Hier war lediglich eine Steigerung der Expression in CD8<sup>+</sup> peripheren Lymphozyten des ERU-Pferdes verglichen mit den Zellen der augengesunden Kontrolle um 32% zu erkennen (vgl. Abb. 4.18 G und H). Der Unterschied zwischen peripheren und intraokulären Lymphozyten des untersuchten ERU-Pferdes war hingegen eindeutig. Verglichen mit den entsprechenden peripheren Lymphozyten-Subpopulationen bei der ERU stieg die Laktotransferrin-Expression in CD8<sup>+</sup> VL um den Faktor 2,2 (vgl. Abb. 4.18 H und I), in B-Zellen um den Faktor 3,2 (vgl. Abb. 4.18 K und L) und in CD4<sup>+</sup> intraokulären Lymphozyten sogar um den Faktor 6,3 an (vgl. Abb. 4.18 E und F).



**Abb. 4.18:** Veränderung der Laktotransferrin (LTF)-Expression auf  $CD4^+$ ,  $CD8^+$  und B-Zellen ( $CD79\alpha^+$ ) zwischen Lymphozyten aus gesunden PBL (PBL gsd), PBL eines ERU-Tieres (PBL ERU) und VL des ERU-Tieres (VL).

Im obersten Panel (A-C) ist die zur Analyse gegatete Lymphozytenpopulation gezeigt. Die folgenden drei Paneele sind Darstellungen der Doppelfärbungen von LTF mit einem Populationsmarker (D-F:  $CD4$ ; G-I:  $CD8$ ; J-L:  $CD79\alpha$ ) und beziehen sich auf die Zellen innerhalb der roten Markierung in A, B oder C. Pro Panel sind jeweils Lymphozyten des gesunden Tieres (A, D, G und J), des an ERU erkrankten Tieres (B, E, H und K) und VL desselben an ERU erkrankten Tieres (C, F, I und L) vergleichend angeordnet. In A-C bezeichnet die Y-Achse den Sideward Scatter (SSC), die X-Achse

den Forward Scatter (FSC). In D-L ist auf der Y-Achse die Expression von CD4 (T-Helferzellen), CD8 (zytotoxische T-Zellen) oder CD79 $\alpha$  (B-Zellen), auf der X-Achse die Expression von LTF aufgetragen. Im oberen linken Quadranten finden sich die einfach Marker-positiven, im unteren rechten die einfach LTF-positiven Events. Der untere linke Quadrant enthält die negativen Events und der obere rechte die für beide entsprechenden Proteine positiven. Zusätzlich befindet sich in jedem oberen rechten Quadranten der Wert der mittleren Fluoreszenzintensität von LTF für die Marker-positive Population. LTF ist in allen Lymphozyten-Subpopulationen von VL stärker exprimiert als in denen der peripheren Lymphozyten bei ERU.

## **4.5 Identifikation differentiell exprimierter Proteine auf der Zelloberfläche peripherer und intraokulärer Lymphozyten bei an ERU erkrankten Pferden**

Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe (Degroote et al. 2013) und die hier bereits beschriebenen Experimente zur Regulation von Vimentin und Laktotransferrin deuteten darauf hin, dass zwischen den Proteomen peripherer und intraokulärer Lymphozyten große Unterschiede bestehen könnten. Deshalb legten wir im nächsten Experiment unser Augenmerk auf die Untersuchung von Proteinen, die zwischen diesen beiden Zellpopulationen differentiell exprimiert sind. Von besonderem Interesse war dabei die Identifikation differentiell regulierter Oberflächenproteine, da diese im Immungeschehen von herausragender Bedeutung sind, zum Beispiel für die T-Zell-Aktivierung (Rocha-Perugini et al. 2014) und die Transmigration von Leukozyten über Endothelien (Devine et al. 1996).

### **4.5.1 Die vergleichende Untersuchung der Proteome von peripheren Blut- und intraokulären Lymphozyten von ERU-Patienten ergab 146 differentiell regulierte Proteine**

Durch die massenspektrometrische Untersuchung der durch Oberflächenbiotinylierung von peripheren und intraokulären Lymphozyten eines ERU-Pferdes gewonnenen Zelloberflächenmembranproteinfraction konnten 146 mindestens zweifach differentiell abundante Proteine identifiziert werden. Der Anteil von Oberflächenproteinen an diesen betrug 75%, was für eine ausgezeichnete Anreicherung dieser Proteinfraction durch die Oberflächenbiotinylierung spricht. Keines der hier identifizierten Proteine wurde bislang auf ins Auge transmigrierten

Zellen bei der ERU beschrieben. Von den 146 differentiell regulierten Proteinen waren 70 auf der Oberfläche peripherer Blutlymphozyten stärker exprimiert als auf intraokulären Lymphozyten. Darunter befand sich beispielsweise CD90 (Tab. 4.4 Nr. 57), ein Oberflächenprotein, das von unserer Arbeitsgruppe bereits als in Blutleukozyten verglichen mit VL stärker exprimiert beschrieben wurde, jedoch auf Granulozyten (Degroote et al. 2013).

Nr. <sup>A</sup>	Proteinname <sup>B</sup>	Accession Nummer <sup>C</sup>	Ratio <sup>D</sup>
1	CD66	ENSECAP00000008127	56593,3
2	CD100	ENSECAP00000008174	444,2
3	T-cell receptor beta chain	ENSECAP00000011995	33,4
4	Saee class I histocompatibility antigen, A alpha chain-like isoform X1	ENSECAP00000010079	19,5
5	Interferon receptor 1	ENSECAP00000008392	15,9
6	Solute carrier family 25, member 3	ENSECAP00000012953	11,4
7	Phosphate regulating endopeptidase homolog, X-linked	ENSECAP00000009684	11,0
8	Laktotransferrin	ENSECAP00000019516	9,9
9	Desmoplakin	ENSECAP00000001665	7,2
10	Sialic acid-binding Ig-like lectin 5	ENSECAP00000022556	6,8
11	TNF receptor superfamily, member 6	ENSECAP00000011566	6,2
12	15 kDa protein B	ENSECAP00000022058	6,1
13	Nicastrin	ENSECAP00000007678	5,9
14	Desmoplakin	ENSECAP00000023013	5,6
15	Stomatin	ENSECAP00000010841	5,6
16	Keratin, type II cytoskeletal 6A	ENSECAP00000012631	5,3
17	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta	ENSECAP00000019551	4,7
18	Elongation factor 1-alpha	ENSECAP00000003695	4,6
19	CD116	ENSECAP00000014118	4,6
20	Keratin 16	ENSECAP00000004544	4,5
21	Solute carrier family 30, member 1	ENSECAP00000002068	4,4
22	Keratin 24	ENSECAP00000013915	4,4
23	Sialic acid-binding Ig-like lectin 14	ENSECAP00000000401	4,4
24	Keratin 75	ENSECAP00000008235	4,3
25	Cofilin 1	ENSECAP00000017389	4,2
26	Desmoglein 1	ENSECAP00000015847	4,1
27	CD6	ENSECAP00000009210	4,1
28	Chromosome 6 open reading frame 25	ENSECAP00000019809	4,0
29	Lambda-immunoglobulin	ENSECAP00000012711	3,9
30	Albumin	ENSECAP00000009171	3,8
31	CD14	ENSECAP00000001239	3,6
32	Keratin 17	ENSECAP00000014186	3,4
33	Keratin 14	ENSECAP00000009507	3,3



34	Voltage-dependent anion channel 3	ENSECAP00000000534	3,3
35	Junction plakoglobin	ENSECAP00000018374	3,3
36	CD177	ENSECAP00000012772	3,0
37	Haptoglobin	ENSECAP00000019071	3,0
38	C-X-C chemokine receptor type 2-like isoformX1	ENSECAP00000004791	3,0
39	Keratin 1	ENSECAP00000019935	3,0
40	Keratin 5	ENSECAP00000018010	2,9
41	CD163	ENSECAP00000016725	2,9
42	C-type lectin domain family 5, member A	ENSECAP00000006732	2,8
43	Annexin A2	ENSECAP00000011087	2,8
44	Pyruvate kinase isozymes M1/M2 isoform M2	ENSECAP00000006544	2,8
45	CD79a	ENSECAP00000005291	2,8
46	Triggering receptor expressed on myeloid cells-like 1	ENSECAP00000010371	2,8
47	Plakophilin 1	ENSECAP00000012989	2,7
48	Keratin 13	ENSECAP00000015063	2,7
49	ATPase, Ca++ transporting, plasma membrane 4	ENSECAP00000004686	2,6
50	EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 2-like isoform X1	ENSECAP00000008674	2,6
51	Keratin 80	ENSECAP00000016750	2,6
52	MHC class I heavy chain	ENSECAP00000021590	2,6
53	Profilin	ENSECAP00000001190	2,5
54	Tubulin, beta 4A class Iva	ENSECAP00000011439	2,5
55	Keratin 10	ENSECAP00000018005	2,4
56	Complement C4-A isoform X1	ENSECAP00000007506	2,4
57	CD90	ENSECAP00000007841	2,4
58	Fatty acid binding protein 5	ENSECAP00000006891	2,3
59	CD226	ENSECAP00000005615	2,2
60	CD148	ENSECAP00000022309	2,2
61	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, A	ENSECAP00000009347	2,2
62	STEAP family member 4	ENSECAP00000016477	2,2
63	Guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polypeptide 2	ENSECAP00000000530	2,1
64	MHC class I heavy chain	ENSECAP00000009264	2,1
65	CD45	ENSECAP00000006018	2,1
66	CD87	ENSECAP00000019648	2,0
67	CD3g	ENSECAP00000003947	2,0
68	Peroxiredoxin-1	ENSECAP00000006859	2,0
69	CD29	ENSECAP00000020201	2,0
70	Solute carrier family 44, member 2	ENSECAP00000009162	2,0

**Tab. 4.4:** Massenspektrometrisch identifizierte Proteine des Oberflächenproteoms von peripheren und intraokulären Lymphozyten bei der ERU, die peripher mindestens zweifach stärker exprimiert waren als intraokulär. A: Fortlaufende Nummer; B: Name des identifizierten Proteins; C: Identifikationsnummer des Proteins aus Ensembl-Datenbank ([http://www.ensembl.org/Equus\\_caballus/Info/Index](http://www.ensembl.org/Equus_caballus/Info/Index)); D: Ratio (Verhältnis der Expression des Proteins auf peripheren Lymphozyten zu der auf VL).

In intraokulären Lymphozyten waren, verglichen mit peripheren Lymphozyten, 76 Proteine mindestens um den Faktor zwei hochreguliert. Zahlreiche Proteine dieser Liste besitzen in anderen Spezies interessante Funktionen bei der Immunregulation, wie beispielsweise CD150 (Tab 4.5 Nr. 46), das eine wichtige Rolle bei der Infiltration von murinen Leukozyten in entzündetes Gewebe spielt (van Driel et al. 2012) und CD166 (Tab 4.5 Nr. 31), welches beim Menschen an der Aktivierung und Differenzierung von Lymphozyten beteiligt ist (Cayrol et al. 2008).

Nr. <sup>A</sup>	Proteinname <sup>B</sup>	Accession Nummer <sup>C</sup>	Ratio <sup>D</sup>
1	Sushi domain containing 2	ENSECAP00000022647	Unendlich
2	Chromosome 16 open reading frame 54	ENSECAP00000002365	Unendlich
3	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A-like isoform 1	ENSECAP00000014221	Unendlich
4	Cell adhesion molecule 1	ENSECAP00000013033	Unendlich
5	Transmembrane protein 30A	ENSECAP00000011887	Unendlich
6	Immunoglobulin gamma 1 heavy chain constant region	ENSECAP00000002609	Unendlich
7	MHC class I antigen 2.5	ENSECAP00000002720	Unendlich
8	Solute carrier family 28 (sodium-coupled nucleoside transporter), member 1	ENSECAP00000006390	Unendlich
9	Phosphoglycerate mutase	ENSECAP00000004158	Unendlich
10	CD51	ENSECAP00000020829	Unendlich
11	Integrin alpha FG-GAP repeat containing 3	ENSECAP00000022543	Unendlich
12	Unc-13 homolog D	ENSECAP00000014911	Unendlich
13	Glycoprotein VI	ENSECAP00000019992	Unendlich
14	Pro-platelet basic protein (chemokine (C-X-C motif) ligand 7)	ENSECAP00000010413	Unendlich
15	Filamin A, alpha	ENSECAP00000009429	Unendlich
16	Single immunoglobulin and toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain	ENSECAP00000019699	Unendlich
17	N-formyl peptide receptor 2-like isoform X1	ENSECAP00000004429	363776,1
18	CD120b	ENSECAP00000010485	326801,5
19	Mannose-6-phosphate receptor (cation dependent)	ENSECAP00000019515	243,4
20	Glycoprotein Ib, alpha polypeptide	ENSECAP00000001701	41,0
21	P2X purinoceptor	ENSECAP00000008383	24,1
22	S100 calcium binding protein P	ENSECAP00000021450	23,4
23	CD182	ENSECAP00000004745	18,5
24	Acetyl-CoA carboxylase alpha	ENSECAP00000010805	15,1
25	Interleukin 1 receptor accessory protein	ENSECAP00000004063	8,7
26	Matrix metalloproteinase 25	ENSECAP00000009007	7,5
27	Keratin, type I cuticular Ha4	ENSECAP00000002307	7,3
28	Transportin 2	ENSECAP00000012020	7,3
29	Methylcrotonoyl-CoA carboxylase 1 (alpha)	ENSECAP00000006747	6,5
30	MHC class I	ENSECAP00000017390	6,4

# Ergebnisse

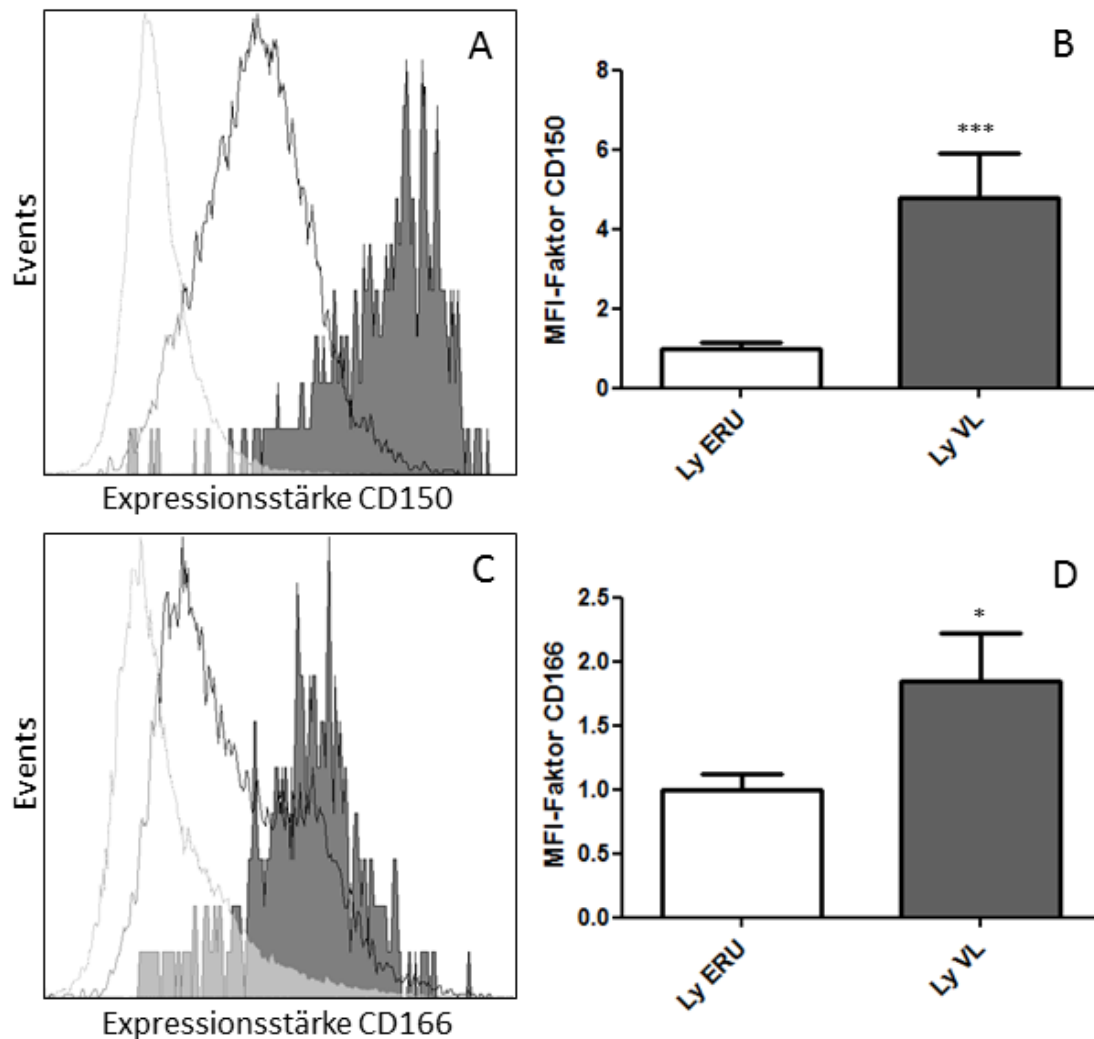
31	CD166	ENSECAP00000016606	5,7
32	Purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 10	ENSECAP00000002198	5,5
33	Sulfide:quinone oxidoreductase, mitochondrial	ENSECAP00000007030	4,6
34	Immunoglobulin superfamily, member 6	ENSECAP00000015774	4,5
35	CD28	ENSECAP00000020326	4,3
36	Hemoglobin subunit zeta	ENSECAP00000014183	4,3
37	Hemoglobin subunit beta	ENSECAP00000008056	4,2
38	Endoplasmic reticulum protein 44	ENSECAP00000014717	4,0
39	CD63	ENSECAP00000017837	3,9
40	CD85a	ENSECAP00000020461	3,9
41	Transmembrane protein 154	ENSECAP00000019976	3,9
42	MHC class II DQ-alpha chain	ENSECAP00000021755;E NSECAP00000004800	3,8
43	Immunoglobulin-like transcript 11 A	ENSECAP00000014089	3,8
44	CD16a	ENSECAP00000005110	3,7
45	Anoctamin 6	ENSECAP00000010736	3,5
46	CD150	ENSECAP00000012154	3,5
47	Sialic acid-binding Ig-like lectin 11-like isoform X2	ENSECAP00000021673	3,3
48	Voltage-dependent anion channel 2	ENSECAP00000013147	3,2
49	Triggering receptor expressed on myeloid cells-like 2	ENSECAP00000013925	3,2
50	Leukocyte elastase inhibitor	ENSECAP00000008115	3,0
51	CD80	ENSECAP00000001529	3,0
52	MHC class II DR-beta chain	ENSECAP00000018340	2,9
53	CD268	ENSECAP00000018087	2,9
54	Cytochrome b-245, beta polypeptide	ENSECAP00000015910	2,8
55	Patr class I histocompatibility antigen, A-2 alpha chain-like isoform X4	ENSECAP00000008796	2,7
56	ATP synthase subunit alpha	ENSECAP00000019276	2,7
57	Galectin-9C-like isoform X9	ENSECAP00000018064	2,7
58	Tetraspanin 14	ENSECAP00000005872	2,6
59	CD3e	ENSECAP00000012382	2,6
60	CD300c	ENSECAP00000007689	2,5
61	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	ENSECAP00000022397	2,5
62	CD49e	ENSECAP00000022617	2,4
63	CD147	ENSECAP00000010130	2,4
64	Sushi domain containing 3	ENSECAP00000013090	2,4
65	CD151	ENSECAP00000010349	2,3
66	G protein-coupled receptor 183	ENSECAP00000020878	2,3
67	Guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polypeptide 3	ENSECAP00000007976	2,2
68	STEAP family member 3, metalloredutase	ENSECAP00000004746	2,2
69	Transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 2	ENSECAP00000004157	2,2
70	Dystroglycan 1	ENSECAP00000007588	2,2
71	Aquaporin 3	ENSECAP00000018712	2,2
72	CSE1 chromosome segregation 1-like (yeast)	ENSECAP00000013844	2,2
73	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 14	ENSECAP00000006763	2,1

<b>74</b>	CD8a	ENSECAP00000011123	<b>2,1</b>
<b>75</b>	CD82	ENSECAP00000017893	<b>2,0</b>
<b>76</b>	Actin, beta	ENSECAP00000013637	<b>2,0</b>

**Tab. 4.5:** Massenspektrometrisch identifizierte Proteine des Oberflächenproteoms von peripheren und intraokulären Lymphozyten bei der ERU, die intraokulär mindestens zweifach stärker exprimiert waren als peripher. A: Fortlaufende Nummer; B: Name des identifizierten Proteins; C: Identifikationsnummer des Proteins aus Ensembl-Datenbank ([http://www.ensembl.org/Equus\\_caballus/Info/Index](http://www.ensembl.org/Equus_caballus/Info/Index)); D: Ratio (Verhältnis der Expression des Proteins in VL zu der in PBL).

#### **4.5.2 Bestätigung der differentiellen Expression von CD150 und CD166 auf peripheren und intraokulären Lymphozyten von ERU-Patienten**

Zu den Proteinen CD150 und CD166, die in VL höher reguliert waren, wurden im Folgenden durchflusszytometrische Untersuchungen durchgeführt. Die Expression beider auf peripheren und intraokulären Lymphozyten von ERU-Pferden konnte mittels dieser Methode nachgewiesen werden. Die auf Grund der massenspektrometrischen Daten angenommene Regulation von CD150 und CD166 bestätigte sich in der Durchflusszytometrie. CD150 war auf intraokulären Lymphozyten höchst signifikant ( $p \leq 0,001$ ) um den Faktor 4,8 ( $\pm 1,1$ ) stärker exprimiert als auf peripheren Lymphozyten (Abb. 4.20 A und B). Die CD166-Expression war auf Lymphozyten aus VL ebenfalls signifikant ( $p \leq 0,05$ ) um den Faktor 1,8 ( $\pm 0,4$ ) gesteigert (Abb. 4.20 C und D).



**Abb. 4.19:** Verifizierung der Regulation von CD150 und CD166 auf peripheren (Ly ERU; weiß) und intraokulären Lymphozyten (Ly VL; grau) bei der ERU.

In A und C sind Überlagerungshistogramme einer repräsentativen durchflusszytometrischen Analyse von Ly ERU und Ly VL dargestellt. Hellgrauer, ungefüllter Graph = Isotypkontrollfärbung auf Ly ERU; schwarzer, ungefüllter Graph = Ly ERU gefärbt mit; grau gefüllter Graph = Ly VL gefärbt mit anti-CD150- (A) oder anti-CD166-Antikörper (C). Die X-Achse bezeichnet hier die Expressionsstärke des jeweiligen Proteins (A: CD150; C: CD166), auf der Y-Achse ist die Zahl der gemessenen Events aufgetragen.

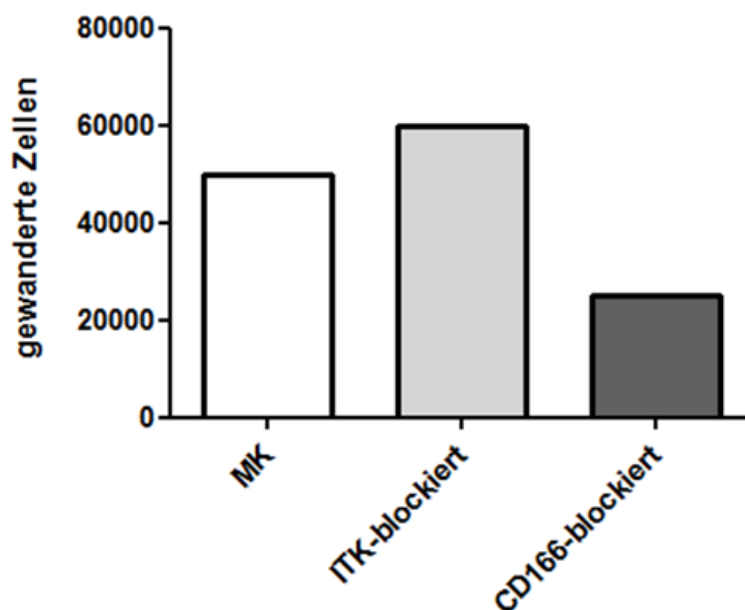
B und D stellen die Expressionsunterschiede von CD150 (B) und CD166 (D) zwischen Ly ERU und Ly VL im Säulendiagramm dar ( $n = 14$ ). Die Y-Achse gibt den Faktor wieder, um den das entsprechende Protein auf Ly VL (graue Säule) im Vergleich zu Ly ERU (weiße Säule) differentiell reguliert ist. Mann-Whitney-Test: \*\*\* =  $p \leq 0,001$ , \* =  $p \leq 0,05$ .

CD150 ist auf Ly VL höchst signifikant um den Faktor  $4,8 (\pm 1,1)$  stärker exprimiert als auf Ly ERU, CD166 ist ebenfalls auf Ly VL stärker exprimiert. Die Regulation um den Faktor  $1,8 (\pm 0,4)$  ist signifikant.

### 4.5.3 CD166 fördert die Migrationsfähigkeit equiner Lymphozyten

Nach der Bestätigung der Hochregulation von CD166 in VL interessierte uns nun besonders, ob die differentielle Expression mit der Transmigrationsfähigkeit equiner PBL bei der ERU im Zusammenhang stehen könnte. Dazu führten wir einen Transmigrationassay mit PBL eines gesunden Pferdes durch, die mit anti-CD166-Antikörper präinkubiert worden waren, um so das Antigen zu blockieren.

Die Blockade von CD166 verursachte interessanterweise eine im Vergleich zur Mediumkontrolle auf 50% und im Vergleich zu mit Isotypkontrollantikörper präinkubierten PBL sogar auf 41% verringerte Migrationsrate equiner PBL durch im Monolayer angeordnete RPE-Zellen (Abb. 4.20). Dieses Ergebnis weist auf eine Bedeutung der erhöhten CD166-Expression auf VL für die vermehrte Transmigration von Leukozyten bei der ERU hin.



**Abb. 4.20:** Einfluss der Blockade von -CD166 auf das Transmigrationsverhalten equiner PBL durch eine konfluente Zellschicht von equinem RPE.

Die Y-Achse zeigt die Zahl gewanderter Zellen nach drei Stunden. Die Zahl der gewanderten Zellen sinkt nach Blockade von CD166 (CD166-blockiert; dunkelgraue Säule) auf 50% der der Mediumkontrolle (MK; weiße Säule) und 41% der mit ITK präinkubierten, gewanderten Zellen (ITK-blockiert; hellgraue Säule).

## 5 DISKUSSION

Die equine rezidivierende Uveitis (ERU) ist eine häufig auftretende Erkrankung in der Pferdepopulation (Swadzba et al. 2012b). Im Verlauf der Krankheit infiltrieren autoreaktive T-Zellen das Auge (Deeg et al. 2001) und die Blut-Retina-Schranke geht zugrunde (Uhl et al. 2014), was schließlich zu retinaler Degeneration und in letzter Konsequenz zur Erblindung des betroffenen Auges führt (Fritz et al. 2014). Aus Tierschutzgründen ist ein beidseitig erblindetes Pferd zu euthanasieren.

Die ERU ist eine Autoimmunerkrankung, die durch ihren rezidivierenden Verlauf gekennzeichnet ist (Uhl et al. 2014). Die Entstehung dieser Rezidive lässt sich auf mehrere molekulare Mechanismen zurückführen (Caspi et al. 1993, Deeg et al. 2006a, Wildner and Diedrichs-Moehring 2005). Dabei spielen wahrscheinlich vor allem das Epitop Spreading (Deeg et al. 2006a) und die molekulare Mimikry (Wildner and Diedrichs-Moehring 2005) eine Rolle. Beim Epitop Spreading geht die Immunreaktion von einem ursprünglich targetierten, körpereigenen Antigen auf ein Epitop dessen im gleichen (intramolekulares Epitop Spreading) oder einem anderen Protein (intermolekulares Epitop Spreading) (Deeg et al. 2006a) über. Durch molekulare Mimikry verlagert sich die Immunreaktion auf ein körpereigenes Protein, welches dem meist körperfremden Auslöser der Immunreaktion auf molekularer Ebene ähnlich ist (Wildner and Diedrichs-Moehring 2005). Ein weiterer Mechanismus ist die Aktivierung nicht-Autoantigen-spezifischer T-Zellen und anderer Leukozyten (Caspi et al. 1993), sogenannter Bystander-Zellen, welche die Art der Immunantwort modulieren können (Nian et al. 2012) und so möglicherweise ebenfalls Einfluss auf das rezidivierende Bild der ERU nehmen. Die klinischen und pathophysiologischen Charakteristika der ERU ähneln weitestgehend denen der humanen autoimmunen Uveitis (Deeg et al. 2011). Untersuchungsmaterial von an ERU leidenden Pferden ist im Vergleich zu menschlichen Zellen und Geweben verhältnismäßig einfach zu beschaffen (Deeg et al. 2002a) und steht durch das spontane Auftreten der Erkrankung in der gesamten Pferdepopulation (Gilger and Michau 2004) in großer biologischer Vielfalt zur Verfügung. Durch diese hohe biologische Variabilität haben statistisch signifikante Daten aus Experimenten mit biologischen Replikaten bei der ERU größere Aussagekraft als bei experimentellen Nagermodellen (Caspi 2014, Degroote et al. 2014). Außerdem gibt uns die ERU die einzigartige Möglichkeit, eine spontan auftretende Form der Uveitis mit der experimentell induzierten Erkrankung

innerhalb ein und derselben Spezies zu vergleichen, was uns wertvolle Informationen hinsichtlich der Anwendbarkeit von Tiermodellen auf das humane Leiden gibt (Deeg et al. 2002b). Dadurch qualifiziert sich die ERU als ein ideales Tiermodell für die humane autoimmune Uveitis.

Da es sich bei der ERU um eine T-Zell-medierte Erkrankung handelt, spielen Lymphozyten für ihre Pathogenese eine herausragende Rolle (Regan et al. 2012). Diese Zellen exprimieren eine Vielzahl von Molekülen, die in Mäusen beispielsweise in Mechanismen der Chemotaxis, Signaltransduktion, Adhäsion an Gewebeschranken und Transmigration über diese im Rahmen von Entzündungen mitwirken (Doucette et al. 2015, Hwang et al. 2015, Nishikimi et al. 2014). Ein solches Protein ist Septin7, für welches in dieser Arbeit eine differentielle Regulation bei der ERU festgestellt werden konnte. Septin7 ist eine aus der Familie der Septine stammende zytoskelettale GTPase, die mit anderen Septinen Heteromere bildet (Degroote et al. 2014). Die so entstehenden Septin-Filamente ordnen sich korsettartig im Zytoplasma an und stabilisieren die äußere Form der Zellmembran (Tooley et al. 2009). Ist der Vorgang der Septin-Polymerisierung gestört, ergibt sich aus der mangelnden Stabilisierung des Zytoskeletts eine verminderte Formstabilität der Zelle (Tooley et al. 2009). In einer Studie von Tooley et al. konnte eine gesteigerte Transmigrationsrate Septin7-defizienter muriner T-Zellklone durch bis zu 3 µm kleine Poren beobachtet werden, was sogar die Größe ihrer Zellkerne unterschreitet (Tooley et al. 2009). Paradoxe Weise waren diese Zellen jedoch weniger dazu in der Lage, gerichtete Bewegungen auszuführen und besaßen insgesamt eine niedrigere Motilität als solche mit physiologischer Septin7-Expression (Tooley et al. 2009). Septin7 ist der bedeutendste Vertreter der Septin-Familie (Tooley et al. 2009). Es wurde nachgewiesen, dass der Knock-Out von Septin7 in T-Zellen von Mäusen eine Defizienz aller Septine bewirkt, während der Knock-Out eines beliebigen anderen Mitgliedes der Familie nur auf die Expression dieses einen Septins Auswirkungen hat (Tooley et al. 2009).

In einer Studie unserer Arbeitsgruppe zum Lymphozytenproteom wurde Septin7 in Lymphozyten von gesunden und an ERU erkrankten Pferden nachgewiesen und war mit einem Expressionsrückgang auf 62% in Lymphozyten der ERU-Patienten differentiell reguliert (Degroote et al. 2014). Dieses Protein und seine Rolle bei der Pathogenese der ERU war für uns durch seine wichtigen Funktionen für Motilität und



Migrationsfähigkeit von großem Interesse und sollte im Zuge der vorliegenden Arbeit eingehend untersucht werden.

Bei unseren Experimenten zur ERU stehen wir immer wieder technischen Herausforderungen gegenüber, da spezifische Antikörper gegen Proteine der Spezies Pferd, anders als beispielsweise für Mensch oder Maus, häufig nicht zur Verfügung stehen. Ein Antikörper gegen humanes Septin7 bot sich für unsere Versuche zu diesem Protein an, da laut Herstellerangaben eine Kreuzreaktivität mit equinem Septin7 vorlag (Santa Cruz Biotechnology) (<http://datasheets.scbt.com/sc-20620.pdf>). In den Tests konnte er auch durchaus in vielen Methoden überzeugen, problematisch war für uns allerdings, dass es sich bei diesem Antikörper um einen in Kaninchen erzeugten polyklonalen Antikörper handelt. Das von uns als Isotypkontrolle dafür herangezogene Kaninchenserum zeigte in vielen Methoden eine sehr starke unspezifische Immunreaktion auf die getesteten Zellen, was die Spezifität des Antikörpers in Zweifel stellte. Außerdem ergab die massenspektrometrische Analyse von Präzipitaten aus mehreren, im Vorfeld zur vorliegenden Arbeit durchgeführten, technisch unabhängigen Experimenten zur Immunpräzipitation von Septin7 unter Verwendung dieses Antikörpers keine Anreicherung des Proteins im Vergleich zur Isotypkontrolle. Die Immunpräzipitation war allerdings ein zentraler Punkt in unserer Bestrebung, Septin7-Interaktoren zu identifizieren, weshalb wir uns entschlossen, selbst pferdespezifische monoklonale Antikörper gegen Septin7 zu erzeugen. Die Immunisierung von Ratten und Mäusen mit zwei verschiedenen Peptiden von Septin7 ergab zunächst insgesamt zwölf anti-Septin7-Antikörper-Klone. Diese waren jeweils von einem der Isotypen Maus IgG2a, Ratte IgG1, Ratte IgG2a oder Ratte IgG2c. Die zwölf Antikörper wiesen in den Screeningtests Western Blot und Durchflusszytometrie sehr unterschiedliche Eignungen für den Nachweis von Septin7 mit diesen Techniken auf und so entschieden wir uns letztendlich zur Stabilisierung von sieben der zwölf Klone (Kap. 4.1.2) durch wiederholte Reklonierung. Dabei handelte es sich um jeweils zwei Klone der Isotypen Maus IgG2a (28A4 und 26A4), Ratte IgG1 (20A2 und 1H8) und Ratte IgG2c (19A4 und 12E10) sowie um einen Ratte IgG2a-Klon (17D7), die in den Testversuchen besonders gut an Septin7 des Pferdes gebunden hatten (Tab. 4.1). Nach der Reklonierung wurden die stabilisierten monoklonalen Antikörper in weiteren Methoden genauer charakterisiert (Kap. 4.2). Wir testeten ihre Bindungseigenschaften an equines Septin7 in Western Blot, Durchflusszytometrie, Immunzyto-

und –histochemie und schließlich auch in der Immunpräzipitation und erhielten erfreulicherweise für jede dieser Methoden einen sehr gut geeigneten, monoklonalen, pferdespezifischen Antikörper (Kap. 4.2.2). Für den Western Blot erwies sich ein Ratte IgG1-Klon (1H8) als besonders empfehlenswert (Abb. 4.3 1H8). Auch für vier andere Klone konnte eine gute Eignung zur Detektion von equinem Septin7 in diese Methode nachgewiesen werden (Abb. 4.3 und Tab. 4.2). Diese fünf Klone waren außerdem kreuzreaktiv mit humanem Septin7 und einige auch mit dem entsprechenden Protein von Rind und Huhn (Abb. 4.4). Interessanterweise reagierte ein sechster Klon, der dem Isotyp Ratte IgG2a angehört, im Western Blot nicht mit equinem, dafür aber mit humanem Septin7 (Abb. 4.4 17D7). Da die Sequenzhomologie des Proteins bei Pferd, Mensch, Rind und Huhn mit jedem der beiden zur Immunisierung verwendeten equinen Septin7-Peptide 100% beträgt, ist die hohe Kreuzreaktivität nicht verwunderlich. Vermutlich bewirken posttranslationale Veränderungen bei den jeweiligen Spezies die unterschiedlichen Bindungsaffinitäten der Antikörper-Klone an Septin7 dieser Tierarten.

In der Durchflusszytometrie eigneten sich zwei Klone besonders gut für die Detektion von Septin7 im Pferd, je einer der Isotypen Maus IgG2a (26A4) und Ratte IgG2c (12E10) (Abb. 4.5 und Tab. 4.2).

In der Immunzytochemie von equinen peripheren Blutleukozyten (PBL) waren sechs der sieben Klone in der Lage, Septin7 zu binden (Abb. 4.6 und Tab. 4.2). Nur nach der Inkubation mit einem Klon des Isotyps Ratte IgG2a (17D7) zeigte sich keine Färbung. Für weitere immunzytochemische Studien sollten bevorzugt die beiden Maus IgG2a-Klone verwendet werden, da die entsprechende Isotypkontrolle wie erwünscht keine Bindung an equine PBL zeigte. Die Isotypkontrollen der aus Ratten gewonnenen anti-Septin7-Antikörper bewirkten hingegen eine mit dem jeweiligen Antikörper-Klon vergleichbare Färbung der Zellen, was diese als ungeeignet für die Darstellung von equinem Septin7 mittels Immunzytochemie kennzeichnet.

Die Immunhistochemie von Lymphknoten des Pferdes gab ein ganzheitliches Bild der Antikörperbindung an Septin7 der verschiedenen Zellpopulationen innerhalb dieses Organs wider. Da es sich bei Septin7 um ein in allen Lymphozytenpopulationen des Pferdes hochabundant exprimiertes Protein handelt (Degroote et al. 2014), war im Lymphknoten eine Färbung annähernd aller Zellen zu erwarten. Dieses Bild zeigte sich bei den Klonen des Isotyps Maus IgG2a, die erneut, wie auch bereits in der Immunzytochemie, vollends überzeugen konnten (Abb. 4.7 Panel mIgG2a). Zudem

zeigte sich hier nun auch einer der Ratte IgG1-Klone (1H8) deutlich positiv (Abb. 4.7 1H8). Die beiden Klone des Isotyps Ratte IgG2c induzierten eine Färbung in einigen wenigen Zellen, die aber ebenso von ihrer Isotypkontrolle angefärbt wurden (Abb. 4.7 Panel rIgG2c). Somit sind diese Klone nicht für die Immunhistochemie geeignet.

Die Schwierigkeit bei der Immunzytochemie im Vergleich zur Immunhistochemie liegt darin, dass einzelne Zellen betrachtet werden, die ohne zusätzliche Färbung mit einem Populationsmarker, wie zum Beispiel Cluster of Differentiation (CD) 4 oder CD8, keiner Subpopulation zugeordnet werden können. Die Subpopulation der angefärbten Zellen ist selbstverständlich auch bei der immunhistochemischen Einfachfärbung nicht einwandfrei feststellbar, doch zeigen sich die Zellen hier in einem Verband und die Verteilung der angefärbten Zellen zueinander kann beurteilt werden. Dadurch konnte in diesem Versuch den Ratte IgG2c-anti-Septin7-Antikörper-Klonen eindeutig die Eignung für die Immunhistochemie abgesprochen werden, da die Färbemuster sich hier sowohl für die Klone, als auch für deren Isotypkontrolle auf ein und dieselbe Weise im Lymphknoten verteilten und die in allen Zellen erwartete Anfärbung von Septin7 nicht erreicht wurde (Abb. 4.7 Panel rIgG2c). Hingegen ist es schwierig, die Eignung der beiden Antikörper für die Immunzytochemie grundsätzlich auszuschließen, da hier die Zellen solitär vorlagen und eine Zuordnung dieser zu bestimmten Subpopulationen nur mittels Doppelfärbung mit einem Populationsmarker wie zum Beispiel CD4 möglich gewesen wäre. Wie der Antikörperklon 1H8 vom Isotyp Ratte IgG1 zeigte, dessen Isotypkontrolle in der Immunzytochemie ein ähnliches Bild ergab wie der Klon selbst (vgl. Abb. 4.6 1H8 und Abb 4.6 ITK Panel rIgG1), in der Immunhistochemie aber klar Zellen anfärbte während die Isotypkontrolle sich negativ darstellte (vgl. Abb. 4.7 1H8 mit Abb 4.7 ITK Panel rIgG1), sind die immunzytochemischen Ergebnisse bei fraglicher Reaktivität der Isotypkontrollen weiterer Prüfung zu unterziehen.

Überraschenderweise konnten alle Klone bis auf einen des Isotyps Ratte IgG1 (20A2) Septin7 aus einem Lysat von equinen PBL präzipitieren (Abb. 4.8). Als besonders geeignet zeigte sich der Klon vom Isotyp Ratte IgG2a (17D7), der in allen sonstigen Methoden Septin7 des Pferdes nicht detektieren konnte (Abb. 4.8 und Tab. 4.2).

Zusammengefasst lässt sich also sagen, dass die Produktion von spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen equines Septin7 äußerst erfolgreich verlief. Die Immunisierung mit dem C-terminalen Peptid von Septin7 (Septin7-1) erzeugte sechs

der sieben zur Stabilisierung ausgewählten Klone. Diese sechs konnten nach der Stabilisierung durch Reklonierung weiterhin überzeugen, während der Klon 20A2, der auf das Peptid Septin7-2 reagieren sollte, sich nach der Stabilisierung für keine der in dieser Arbeit getesteten Methoden mehr eignete (Tab. 4.2). Im Western Blot bindet der Klon 1H8 des Isotyps Ratte IgG1 besonders gut und ohne unspezifische Hintergrundsignale an equines Septin7. Für die Detektion des Proteins in der Durchflusszytometrie eignet sich vor allem der Ratte IgG2c-Klon 12E10. Die Maus IgG2a-Klone 28A4 und 26A4 sind hervorragend für die Septin7-Färbung in der Immunzytochemie einsetzbar, der Klon 28A4 außerdem für die Immunhistochemie. Der Klon 17D7 des Isotyps Ratte IgG2a ist besonders gut für die Immunpräzipitation von Septin7 geeignet.

Nach der erfolgreichen Synthese und Charakterisierung der monoklonalen anti-equines Septin7-Antikörper konnten die Versuche zur differentiellen Expression von Septin7 in Lymphozyten aus PBL und aus vitrealen Leukozyten (VL) von ERU-Pferden beginnen. Septin7 konnte dabei erstmals in VL des Pferdes nachgewiesen und quantifiziert werden (Abb. 4.9 und 4.10). In einer früheren Studie unserer Arbeitsgruppe war die Expression von Septin7, wie bereits erwähnt, in peripheren Lymphozyten von an ERU erkrankten Pferden im Vergleich zu augengesunden Kontrollen auf 62% zurückgegangen (Degroote et al. 2014). Umso überraschender war es, dass die Septin7-Expression im aktuellen Versuch in den intraokulären Zellen von ERU-Patienten um das 4,7-fache im Vergleich zu peripheren Lymphozyten der gleichen Tiere anstieg (Abb. 4.9). Dieser Expressionsanstieg vollzog sich sowohl in CD4<sup>+</sup>, als auch in CD8<sup>+</sup> T-Zellen, während Septin7 in intraokulären B-Zellen sogar weniger stark exprimiert war als in peripheren B-Zellen des gleichen ERU-Tieres (Abb. 4.10 und 4.11).

Eine differentielle Regulation von Septin7 wurde bisher außer durch unsere Arbeitsgruppe (Degroote et al. 2014) weder im Zusammenhang mit Uveitiden, noch mit Autoimmunerkrankungen beschrieben (PubMed-Recherche Stand 16.3.2015). Wichtige Funktionen dieses Proteins wurden bislang bei der Proliferation und Migration von Tumorzellen, vor allem in Gliomen, identifiziert (Jia et al. 2010, Xu et al. 2010). So konnte gezeigt werden, dass in den humanen Gliomzelllinien TJ905, TJ899, TJ862 und U251, in nativen Gliomzellen des Menschen und auch im Mausmodell subkutan induzierter Gliome eine geringere Septin7-Expression mit schnellerem Tumorwachstum und höherer Proliferationsrate der Gliomzellen

assoziiert war (Jia et al. 2010). Die Transfektion von Septin7 in humane Gliomzelllinien minderte hingegen die Zellteilungsrate durch Inhibition positiver und Induktion negativer Regulatoren des Übergangs vom inaktiven Zellstadium in den Teilungszyklus (G1/S-Phase) (Jia et al. 2010). Zudem war eine erhöhte Septin7-Expression *in vitro* auch mit einer gesteigerten Apoptoserate von U251-Tumorzellen assoziiert (Jia et al. 2010). Eine Beteiligung von Septin7 an Apoptose und Proliferation ist bisher in Lymphozyten nicht beschrieben (PubMed-Recherche Stand 16.3.2015), könnte aber im Rahmen der ERU auch in diesen Zellen von großer Relevanz sein. So könnte eine durch Septin7-Defizienz bedingte erhöhte Proliferations- und verringerte Apoptoserate ins Auge transmigrierter, autoreaktiver T-Zellen zur Pathogenese der ERU beitragen. Durch Silencing- und Transfektionsversuche zu Septin7 in equinen Lymphozyten und anschließende Proliferationsassays könnte der Einfluss der Septin7-Expression auf die Teilungs- und Apoptoserate dieser Zellen überprüft werden.

Außer der Septin7-abhängigen Veränderung der Teilungs- und Apoptoserate konnte in einer anderen Studie durch Transfektion von Septin7 in zwei humane Gliomzelllinien, die Septin7 konstitutionell nicht (TJ899) oder nur in geringem Maße exprimieren (U251) (Jia et al. 2010), die Migration dieser Zellen gehemmt werden (Xu et al. 2010). Daraus leiteten die Autoren eine Rolle der verminderten Septin7-Expression bei der Invasion von Tumorzellen in gesundes Gewebe ab (Xu et al. 2010). Diese Schlussfolgerung bezüglich der Bedeutung einer veränderten Septin7-Expression für die Migrationsfähigkeit motiler Zellen wurde auch in einer anderen Studie gezogen. In einer murinen T-Zelllinie, deren Septin7-Expression durch short hairpin (sh) RNA verringert worden war, zeigte sich eine deutliche Steigerung der Migrationsrate (Tooley et al. 2009), was die Beobachtungen von Xu und Kollegen an Gliomzellen (Xu et al. 2010) unterstrich. Frühere Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe (Degroote et al. 2014) zeigten eine in peripheren Lymphozyten von ERU-Patienten geringere Septin7-Expression als in gesunden Kontrollzellen, was auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden konnte (vgl. Abb. 4.9 weiße und hellgraue Säule, Abb. 4.10 Panel Ly gsd und Ly ERU). In Verbindung mit der Erkenntnis, dass T-Lymphozyten in den meisten ERU-Fällen die vorrangig in uveitische Augen transmigrierenden Zellen sind (Deeg et al. 2001, Regan et al. 2012), könnte daraus also geschlossen werden, dass möglicherweise auch bei ERU-kranken Pferden eine verringerte lymphozytäre Septin7-Expression für die starke Infiltration der Zellen

ins Auge verantwortlich ist. Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurde jedoch festgestellt, dass aus dem ERU-Auge isolierte Lymphozyten eine deutliche, wenn auch nicht signifikante, Mehrexpression von Septin7 im Vergleich zu peripheren Lymphozyten von ERU-Pferden aufwiesen (vgl. Abb. 4.9 hell- und dunkelgraue Säule). Es stellte sich also die Frage, inwiefern sich die Septin7-Expression in Pferdelymphozyten auf die Migrationseigenschaften dieser Zellen durch die Blut-Retina-Schranke (BRS) des Pferdes auswirken.

Um dies zu untersuchen wurde die Septin7-Expression equiner Kontroll-PBL durch RNA-Interferenz um 50% reduziert (Abb. 4.12 A) und mit diesen Zellen ein Transmigrationsassay über konfluent gewachsene, gesunde equine retinale Pigmentepithel (RPE)-Zellen durchgeführt. Da das Pferd eine weitestgehend avaskuläre Retina besitzt (Uhl et al. 2014), spielen retinale Endothelzellen für die Integrität der BRS in dieser Spezies nur eine untergeordnete Rolle. Durch ihren einschichtigen Aufbau eignet sich die BRS des Pferdes deshalb sehr gut für die Untersuchung von mit ihr zusammenhängenden pathophysiologischen Vorgängen *in vitro*. Es zeigte sich, dass, wie auf Grundlage der Ergebnisse der Studie an murinen T-Zellen (Tooley et al. 2009) erwartet, die Septin7-defizienten Zellen stärker transmigrierten als die mit Kontroll-siRNA behandelten PBL (Abb. 4.12 B). Allerdings war dieser Anstieg nicht statistisch signifikant und fiel im Vergleich zur murinen Studie, bei der je nach Porengröße der zu transmigrierenden Membran zwei- bis fünfmal so viele Septin7-defiziente wie unbeeinträchtigte Zellen wanderten (Tooley et al. 2009), mit einer Steigerung der Transmigrationsrate um 28% im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen insgesamt geringer aus. In der genannten Studie von Tooley konnte allerdings ein Knock-Down von Septin7 auf 25% erreicht werden (Tooley et al. 2009), während die Septin7-Expression in unserem Experiment nur auf 50% gesenkt werden konnte. Zudem transmigrierten die murinen T-Zellklone nicht über eine zelluläre Barriere, wie in unserem Versuch das RPE, sondern durch künstliche Poren (Tooley et al. 2009), welche möglicherweise einen geringeren Widerstand boten. Letztendlich ist zu bedenken, dass die biologische Variabilität, die in unserem Versuch mit PBL von vier verschiedenen gesunden Pferden hoch und in Tooleys Versuch an Klonen einer einzigen T-Zelllinie gering war, das Ergebnis beeinflusst haben können. Die Durchführung weiterer Transmigrationsexperimente an einer größeren Tierzahl, beispielsweise auch mit nativen PBL von ERU-Tieren im Vergleich zu *in vitro* gesilencten Zellen gesunder Tiere, könnte zukünftig beleuchten,

ob die hier beobachtete vermehrte Wanderung von Septin7-defizienten equinen PBL für die Zellen aller Mitglieder der Pferdepopulation repräsentativ und dann auch von statistischer Signifikanz ist. Auch Unterschiede und Ähnlichkeiten im Transmigrationsverhalten von Zellen, deren Septin7-Expression, wie in den vorliegenden Versuchen, durch small interfering (si) RNA verringert wurde, nativen PBL von ERU-Patienten und solchen mit beispielsweise durch Transfektion weiter erhöhter Septin7-Expression, wie sie *in vivo* in VL auftritt (Abb. 4.9), stellen einen interessanten Ansatz für zukünftige Forschung dar. Durch derartige Untersuchungen könnte der Ursprung der erhöhten Septin7-Expression in VL und eine Beteiligung anderer Proteine an der gesteigerten Migrationsrate beleuchtet und somit die Rolle von Septin7 genauer charakterisiert werden.

Die Ergebnisse des Transmigrationsversuchs an Septin7-geilenkten nativen equinen PBL (Abb. 4.12 B) deuten darauf hin, dass eine verringerte Septin7-Expression in PBL von an ERU erkrankten Pferden genauso wie in murinen T-Zelllinien (Tooley et al. 2009) und humanen Gliomzellklonen (Xu et al. 2010) eine erhöhte Migrationsrate bewirkt. Welche Rolle die unerwarteter Weise erhöhte Expression von Septin7 auf VL von ERU-Pferden in diesem Zusammenhang spielt, ist bislang ungeklärt. Es könnte sich dabei um das Ergebnis regulatorischer Mechanismen im Zuge der Remission nach einem Entzündungsschub handeln, denn alle in dieser Arbeit verwendeten Proben vitrealer Leukozyten wurden in der Phase der Remission gewonnen, da die therapeutischen Pars plana Vitrektomien zur Gewährleistung einer optimalen Wundheilung in der Regel nicht während der akuten Uveitis durchgeführt werden (Werry and Gerhards 1992). Zum Ende eines Entzündungsschubes beim experimentellen Uveitismodell, der EAU, verschiebt sich das Gleichgewicht zwischen aggressiven und regulatorischen T-Zellen zunehmend, bis schließlich die regulatorische Komponente die Oberhand gewinnt (Kerr et al. 2008). Sollte die klinische Besserung auch bei der ERU mit solchen Verschiebungen der T-Zell-Antworten einhergehen, ist es wahrscheinlich, dass ein erheblicher Teil der hier untersuchten intraokulären T-Zellen regulatorischer Natur ist und deshalb das Apoptose-fördernde und Proliferations- und Migrations-hemmende Septin7 stärker exprimiert. Um über die hier untersuchten T-Helferzell-Subtypen Aufschluss zu erlangen, sollte in Zukunft eine eingehende Untersuchung der VL bei ERU-Pferden, vor allem bezüglich ihrer Expression von FoxP3, einem Marker für regulatorische T-Zellen ( $T_{reg}$ ), und IFN $\gamma$ /IL-17, den Markerzytokinen der  $T_H1$ - und  $T_H17$ -Antworten,

erfolgen. Auf diese Weise wäre es möglich, diese Zellen hinsichtlich ihrer Funktion genauer zu charakterisieren und tieferen Einblick in die Pathomechanismen der ERU zu erlangen. Da die hier generierten Daten keine statistische Signifikanz aufwiesen, bleibt weiterhin zu bedenken, dass die Funktionen von Septin7 sich keineswegs auf die Beeinflussung der Transmigrationsfähigkeit beschränken. In zukünftigen Studien sollte also, neben einem möglichen Einfluss von Septin7 auf die Transmigration, vor allem auch seine Beteiligung am Zellzyklus infiltrierter T-Zellen untersucht werden, da die stärkere Abundanz in VL auch auf eine Funktion von Septin7 bei der ERU hindeuten könnte, durch die es Einfluss auf das Überleben autoreaktiver T-Zellen nimmt. Auch im Hinblick auf diese Möglichkeit ist es wichtig, in Zukunft durch Transmigrations- und Proliferationsassays den Einfluss erhöhter und verringerter Septin7-Expressionen in Lymphozyten des Pferdes eingehend zu untersuchen.

Der Mechanismus, über den die Septin7-Expression in Lymphozyten des Pferdes bei der ERU reguliert wird, ist bislang ungeklärt. Um Einblick in das molekulare Zusammenspiel von Septin7 mit anderen Proteinen zu erhalten und so die Funktion von Septin7 bei der ERU genauer zu charakterisieren, führten wir daher im nächsten Schritt eine Immunpräzipitation von Septin7 mit Hilfe eines unserer neu entwickelten monoklonalen Antikörper durch und konnten nach der differentiellen Proteomanalyse und massenspektrometrischen Untersuchung des Präzipitats erstmals Interaktoren von Septin7 in equinen PBL identifizieren. Neben Septin7 selbst (Tab. 4.3, Nr. 13) waren noch 47 weitere Proteine im Präzipitat des anti-Septin7-Antikörpers mindestens 25-fach stärker angereichert als in der Negativkontrolle (Tab. 4.3). Keines dieser Proteine wurde bisher als Septin7-Interaktor beim Pferd beschrieben (PubMed-Recherche Stand 16.3.15). Interessanterweise ergab sich allerdings bei der Analyse der humanen Orthologe der angereicherten Proteine mittels STRING ([www.string-db.org](http://www.string-db.org)) ein Netzwerk, in dem 31 dieser Proteine in funktionellem Zusammenhang mit humanem Septin7 dargestellt wurden.

Am nächsten assoziiert mit Septin7 waren dabei drei weitere Septine, Septin2, 6 und 11 (Tab. 4.3, Nr. 7, 20 und 36), welche durch variable Di- und Heteromerbildung gemeinsam mit Septin7 unter anderem in caninen Nierenzellen (MDCK) (Dolat et al. 2014), humanen Epitheloidzellen (HeLa) (Volceanov et al. 2014) und nach Transfektion der Septin-Gene in *E. coli*-Bakterien (Sheffield et al. 2003) stabile Filamente ausbildeten. Durch Dimerisierung von Septin7 mit Septin6 entsteht, wie in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK)-293 (Tokhtaeva et al. 2015) und auch in



der *E. coli*-Transfektionsstudie (Sheffield et al. 2003) nachgewiesen werden konnte, die stabilste Verbindung. Die so aufgebauten Septin-Filamente stellen das Bindeglied zwischen zytoskelettalen Stressfasern und fokalen Adhäsionszonen an der Plasmamembran dar, welche die Verankerung der Stressfasern bei der Formveränderung der Zelle durch Actin-Polymerisierung gewährleisten (Dolat et al. 2014).

Stressfasern bilden das wichtigste Element der Migrationsfähigkeit verschiedenster Zellen, wie Fibroblasten im Rahmen der Wundheilung (Buonomo et al. 2012), Thrombozyten beim Verschluss von Gefäßlecks (Bauer et al. 2000) oder Immunzellen bei der Transmigration über Endothelien (Konrad et al. 2012). Stressfasern formen einen Zusammenschluss verschiedener Proteine, welche am Auf- und Abbau von Actin-Filamenten sowie deren Kontraktilität beteiligt sind (Vallénus 2013). Erstaunlicherweise wurden sieben solche Proteine, darunter fünf Myosine (Myosin, light chain 6, alkali, smooth muscle and non-muscle; Myosin IG; Myosin, heavy chain 9, non-muscle; Myosin IF; Myosin XVIII A), mit Septin7 ko-präzipitiert (Tab. 4.3, Nr. 5, 15, 32, 39 und 45), was auf eine enge Assoziation zwischen Septin-Heteromeren und Stressfasern auch in equinen Lymphozyten hindeutet. Neben dem kontraktionsvermittelnden Myosin wurden außerdem beta-Actin (Actin, cytoplasmic 2; Tab. 4.3, Nr. 6), das wichtigste zytoskelettale Protein in nicht-Muskelzellen (Tojkander et al. 2012), Tropomyosin (TPM) 3 und TPM4 (Tab. 4.3, Nr. 25 und 27), kalziumbindende Proteine, welche in die Actin-Filamente integriert sind, und  $\alpha$ -Actinin (Tab. 4.3, Nr. 12), welches Actinpolymere von MDCK-Zellen durch Bündelung und Kreuzvernetzung noch zusätzlich stabilisierte (Dolat et al. 2014), mit Septin7 ko-präzipitiert. Auf Grund der Anreicherung von Proteinen des Zytoskeletts in diesem Versuch ist eine Beteiligung von Septin7 an der Regulation der Stabilität und Migrationsfähigkeit von Lymphozyten des Pferdes und damit der Pathogenese der ERU sehr wahrscheinlich.

Mit dem Vorgang der Migration geht die Bildung von Pseudopodien, vor allem Lamellipodien, einher (Krause and Gautreau 2014). Lamellipodien sind sehr flache, breit angelegte Ausstülpungen am vorderen Rand der Plasmamembran, welche ein Gerüst aus verzweigten Actin-Filamenten enthalten (Krause and Gautreau 2014). Die Verzweigung dieser Filamente erfolgt in menschlichen Thrombozyten nach Dissoziation von sogenannten Actin-capping-Proteinen vom bestehenden Actin-Polymer, wodurch die Bindungsstelle für den Actin-related Protein 2/3 (Arp2/3)-

Komplex freigelegt wird (Barkalow et al. 2003). Dieser Komplex initiiert nach seiner Bindung an das Mutterfilament die Y-förmige Aussprossung von Tochterfilamenten (Mullins et al. 1998), was die Ausbreitung des Lamellipodiums und somit die Fortbewegung der Zelle initiiert (Krause and Gautreau 2014). Die Validität des vorliegenden Datensatzes wird durch die Ko-Präzipitation von Septin7 mit den Actin-capping Proteinen Gelsolin, Capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 1 (CAPZA1) und CAPZB (Tab. 4.3, Nr. 4, 35 und 38) sowie der Untereinheit 2 des Arp2/3-Komplexes (ARPC2; Tab. 4.3, Nr. 1) weiter unterstrichen.

Der Arp2/3-Komplex wurde in einer Studie an caninen glatten Muskelzellen durch ein Protein mit Namen Cell division cycle (Cdc) 42 induziert (Tang and Gunst 2004), dessen Aktivierung in MDCK-Zellen indirekt über Inhibition von Borg3, einem Rho-GTPase-bindenden Protein und Interaktor von Cdc42, auch zur Verminderung der Septin7-Heteromerisierung führte (Joberty et al. 2001) und das ebenfalls mit Septin7 ko-präzipitiert wurde (Tab. 4.3, Nr. 3). Sollte die Regulierung von Arp2/3 und Septin7 durch Cdc42 in Lymphozyten des Pferdes auf ähnliche Weise stattfinden wie in den Hundezellen, könnten dadurch die von Tooley et al. beobachteten und oben bereits erwähnten Bewegungsmuster Septin7-defizienter muriner T-Zellklone (Tooley et al. 2009) erklärt werden. In dieser Studie wurde festgestellt, dass sich T-Zellen bei einer Verringerung der Septin7-Expression weniger gerichtet und langsamer fortbewegten als unbeeinträchtigte Zellen und vermehrtes Blebbing zeigten (Tooley et al. 2009). Diese Beobachtungen könnten auf zwei mit Cdc42 assoziierte Mechanismen zurückzuführen sein. Zum einen könnte durch stärkere Arp2/3-Aktivierung eine vermehrte Ausprägung von Lamellipodien stattfinden. Zum anderen verringert sich in Septin7-defizienten Zellen möglicherweise die Kontraktilität der Stressfasern durch Beeinträchtigung der Verbindung dieser zu fokalen Adhäsionszonen. Sollten Tooleys Beobachtungen auf solchen Cdc42-medierten Pfaden basieren, würde dies einen Feedbackmechanismus zwischen der Septin7-Expression und Cdc42-Aktivierung implizieren, bei dem letztere kompensatorisch zunimmt wenn Septin7 niedriger abundant exprimiert wird. In diesem Fall käme es zu den von Tooley et al. beschriebenen Bewegungsmustern (Tooley et al. 2009), ausgelöst durch vermehrte Actin-Verzweigung und Lamellipodienausbildung, jedoch ohne ausreichende Kontraktilität. Die Untersuchung eines solchen Feedbackmechanismus könnte zum Beispiel mittels durchflusszytometrischer Bestimmung der Cdc42-Expression in nativen Septin7-defizienten ERU-Lymphozyten, *in vitro* Septin7-gesilencten und

unbehandelten gesunden Lymphozyten erfolgen. Sollte sich die Feedback-Hypothese zwischen Septin7 und Cdc42 bestätigen, würden in einem solchen Versuch die Septin7-defizienten und gesilenceten Zellen mehr Cdc42 exprimieren als die unbehandelten Lymphozyten. Zudem wäre ein Transmigrationsassay interessant, in welchem mögliche Unterschiede in der Transmigrationsfähigkeit von *in vitro* Septin7-gesilenceten Lymphozyten mit und ohne Cdc42-Gen-Knock-out beleuchtet wird. Dadurch könnte gezeigt werden, welche Rolle Cdc42 bei der vermehrten Transmigration Septin7-defizienter Lymphozyten bei der ERU spielt. Bei Cdc42<sup>-/-</sup> Zellen müsste im Fall der Bestätigung der Hypothese die feedbackgesteuerte Regulation von Arp2/3 durch ein Silencing von Septin7 ausbleiben, was die Migrationsrate bei Septin7-gesilenceten Zellen erneut verändern könnte.

Die String-Netzwerkanalyse der mit Septin7 ko-präzipitierten Proteine ergab einen zusätzlichen Hinweis auf die Rolle von Cdc42. Über die Aktivierung von p21-activated Kinase (PAK) 1 induzierte es in caninen Trachealmuskelzellen die Phosphorylierung eines weiteren zytoskelettalen und mit Septin7 ko-präzipitierten Proteins, Vimentin (Li et al. 2009). Vimentin (Tab. 4.3, Nr. 9), konnte in einer nach der Auswertung der massenspektrometrischen Daten durchgeführten Immunpräzipitation zunächst nicht als Septin7-Interaktor bestätigt werden, da Septin7 im Präzipitat des dabei verwendeten anti-Vimentin-Antikörpers nicht detektierbar war (Abb.4.13  $\alpha$ Vimentin). In den Herstellerangaben des verwendeten anti-Vimentin-Antikörpers ist die Immunpräzipitation nicht als Methode, für die sich der Antikörper eignet, aufgeführt. Da sich Antikörper gelegentlich jedoch auch für Methoden eignen, die der Hersteller im Datenblatt nicht spezifiziert, bezogen wir den anti-Vimentin-Antikörper dennoch in den Versuch mit ein, konnten allerdings keine Immunpräzipitation von Vimentin erzielen. Der Antikörper kann jedoch nach Daten des Herstellers zur Detektion von Vimentin mehrerer Spezies, eingeschlossen dem des Pferdes, im Western Blot herangezogen werden und der Nachweis von Vimentin im Septin7-Präzipitat dieses Versuchs gelang mit dieser Methode (Abb. 4.14  $\alpha$ Septin7), wodurch Vimentin als Interaktor von Septin7 charakterisiert werden konnte. Bei Vimentin handelt sich um ein Typ III-Intermediärfilament (Dave and Bayless 2014), welches in seiner phosphorylierten Form die Flexibilität des Zytoskeletts verschiedener humaner Lymphozytenlinien erhöhte (David et al. 2014). In der durchflusszytometrischen Analyse der Vimentin-Expression ins Auge transmigrierter Lymphozyten von ERU-Pferden zeigte sich eine niedrigere Abundanz

als in den peripheren Lymphozyten des gleichen Tieres und augengesunder Kontrolltiere (Abb. 4.15). Der größte Unterschied konnte dabei zwischen CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten festgestellt werden, wo er zwischen peripheren und intraokulären Lymphozyten des ERU-Patienten etwa 35% betrug (vgl. Abb. 4.16 E und F). Auch in CD8<sup>+</sup> VL sank die Vimentin-Expression, während sie in B-Zellen im Vergleich zu peripheren B-Lymphozyten sogar leicht anstieg (vgl. Abb. 4.16 H und I, K und L). Diese Daten sind als präliminär zu betrachten und müssen mittels einer größeren Tierzahl bestätigt werden, da sie anhand nur eines ERU-Patienten erhoben wurden und unsere Proben von großer biologischer Variabilität sind. Trotzdem sind sie hoch interessant in Bezug auf die übergeordneten Regulationsmechanismen, die möglicherweise von Cdc42 gesteuert werden. Nach Phosphorylierung durch Cdc42 weist Vimentin eine andere Konformation auf als die nicht phosphorylierte Form (Jeong et al. 2013), wodurch das phosphorylierte Protein mittels des hier verwendeten Antikörpers möglicherweise nicht mehr detektiert werden konnte. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse könnten in diesem Fall nicht als Senkung der Vimentin-Expression in VL von ERU-Patienten, sondern möglicherweise als Veränderung des Verhältnisses zwischen nicht-phosphoryliertem und phosphoryliertem Vimentin zu Gunsten des Letzteren zu deuten sein. Eine vermehrte Aktivierung von Cdc42 mit der daraus resultierenden Flexibilitätssteigerung des Zytoskeletts durch Vimentin-Phosphorylierung und Inhibition der Septin7-Polymerisation sowie die vermehrte Verzweigung von F-Actin durch Arp2/3 könnten also erklären, welche Mechanismen der gesteigerten Transmigrationsrate Septin7-defizienter T-Zellen in der vorliegenden und anderen Studien (Tooley et al. 2009) zu Grunde liegen.

Vimentin konnte bereits mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen assoziiert werden (Kinloch et al. 2014, Tesija-Kuna et al. 2010). So konnten in neun von zehn Patienten mit tubulointerstitieller Entzündung im Rahmen des Lupus nephritis hohe anti-Vimentin-Antikörper-Titer festgestellt werden (Kinloch et al. 2014), welche auch bereits in 63% der Patienten mit Rheumatoider Arthritis aufgetreten waren (Tesija-Kuna et al. 2010). Die hier gewonnenen Erkenntnisse über die differentielle Expression von Vimentin in peripheren und intraokulären Lymphozyten bei der ERU liefern also eine interessante Grundlage für die weitere Forschung zur Pathogenese dieser Autoimmunerkrankung des Pferdes. Um zu untersuchen, ob die Phosphorylierung von Vimentin in Lymphozyten bei der ERU zur begünstigten

Transmigration beiträgt und inwieweit eine solche Phosphorylierung hier vorlag, sollten künftig, neben der Untersuchung einer größeren Tierzahl auf ihre lymphozytäre Vimentin-Expression, auch durchflusszytometrische Versuche mit anti-phosphoryliertes Vimentin-Antikörpern durchgeführt werden.

In humanen Leukozyten ko-lokalisierte Vimentin mit zwei weiteren, mit Septin7 ko-präzipitierten Proteinen, S100A8 und S100A9 (Tab. 4.3, Nr. 17 und 26) (Roth et al. 1993). Beim Menschen bildeten S100A8 und S100A9 bei einem Anstieg von intrazellulärem Kalzium ein Heterodimer, genannt Calprotectin, das dazu in der Lage war, die Phagozytenmigration durch Kalzium-abhängige Polymerisierung und Stabilisierung von Tubulinfilamenten zu unterstützen (Schiopu and Cotoi 2013). Homodimere von S100A8 und S100A9 sowie deren Heterodimer waren in humanen Nabelschnurvenen-Endothelzellen (HUVEC), abhängig von der Kalzium-bereitstellung, an der Desorganisation von ZO-1, einem Tight Junction-Protein, und F-Actin beteiligt, was den transepithelialen elektrischen Widerstand der Endothelschicht signifikant senkte (Wang et al. 2014). S100A8 und S100A9 wurden beim Menschen im Proteom vieler verschiedener Zellen, wie Keratinozyten (Sakaguchi et al. 2014), Fibroblasten (Carrion et al. 2013) und fast allen Leukozyten, mit Ausnahme von T-Lymphozyten, in denen sie bisher nicht gefunden werden konnten, zytosolisch oder auf der Zelloberfläche nachgewiesen (Lood et al. 2011). Durch Stimulation ihrer Rezeptoren Toll-like Receptor (TLR) 4 und Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE) stimulieren die beiden S100-Proteine Zellen des angeborenen Immunsystems zur Sekretion proinflammatorischer Zytokine (Jin et al. 2014). Der Komplex Calprotectin wurde bisher nicht als Lymphozytenprotein beschrieben (PubMed-Recherche Stand 16.3.2015), könnte jedoch auch in der ERU eine wichtige Rolle bei der Aktivierung autoreaktiver T-Zellen und deren Übertritt über die zelluläre Barriere, das RPE, spielen. Calprotectin arbeitet in Abhängigkeit von Kalzium (Wang et al. 2014), welches in Lymphozyten des Menschen durch die Aktivierung von Integrinen wie Leukocyte Function-associated Antigen (LFA)-1 und Very Late Antigen (VLA)-4 bei der Adhäsion an Endothelzellen intrazellulär anstieg (Gerli et al. 1998, Ricard et al. 1997).

Ein weiteres immunregulatorisch aktives Protein, welches mit Septin7 ko-präzipitiert wurde, ist Laktotransferrin (Tab. 4.3, Nr. 42). Durch Detektion von Septin7 im Präzipitat eines anti-Laktotransferrin-Antikörpers ist eine Interaktion der beiden Proteine wahrscheinlich, jedoch präzipitierte auch die Isotypkontrolle ein Protein mit

dem Molekulargewicht von Septin7 (Abb. 4.13 ITK zIgG), weshalb zukünftig weitere Untersuchungen zur endgültigen Bestätigung der Interaktion durchgeführt werden müssen. Da Laktotransferrin in früheren Studien unserer Arbeitsgruppe bereits wiederholt in den Datensätzen zum Proteom von equinen Leukozyten vertreten (Degroote et al. 2014, Degroote et al. 2012), jedoch noch nie einer eingehenderen Untersuchung unterzogen worden war, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit in durchflusszytometrischen Studien an equinen peripheren und intraokulären Lymphozyten eine Charakterisierung des Laktotransferrin-Expressionsmusters in diesen Zellen an einer Kohorte ERU-kranker Pferde sowie an peripheren Lymphozyten augengesunder Kontrolltiere durchgeführt (Abb. 4.17). Der Anteil der Zellen, welche Laktotransferrin exprimierten, an der Gesamtzahl untersuchter Lymphozyten war in VL von ERU-Pferden mit 75% am höchsten und in peripheren Lymphozyten augengesunder Tiere mit 54% am niedrigsten (Abb. 4.17 A). Diese Veränderungen waren nicht signifikant, deuteten jedoch auf einen Anstieg der Laktotransferrin-Expression bei der ERU hin, weshalb folgend die Unterschiede in der Expressionsstärke pro Zelle, der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI), analysiert wurden (Abb. 4.17 B). Dabei konnte eine signifikante 8,8-fache Steigerung der Laktotransferrin-Expression in der Lymphozytenfraktion von VL gegenüber peripheren Lymphozyten in der ERU detektiert werden. In einem weiteren durchflusszytometrischen Experiment wurde nun bestimmt, auf welchen Lymphozytensubpopulationen sich die Laktotransferrin-Expressionssteigerung in VL vollzieht (Abb. 4.18). Eine solche Untersuchung zu Subpopulationen Laktotransferrin-exprimierender Lymphozyten war unseres Wissens bis dahin noch nie durchgeführt worden (PubMed-Recherche Stand 16.3.15). Dabei zeigte sich die stärkste Regulation in  $CD4^+$  Zellen, in denen in VL 6,3-mal so viel Laktotransferrin detektiert werden konnte wie in peripheren Lymphozyten des gleichen Tieres (vgl. Abb. 4.18 E und F). Aber auch die  $CD8^+$  und B-Zellen exprimierten in VL Laktotransferrin stärker als in den peripheren Zellen des ERU-kranken Tieres (vgl. Abb. 4.18 H und I, K und L), wobei insgesamt nur wenig Laktotransferrin durch B-Zellen exprimiert wurde (Abb. 4.18 J-L). Der starke Anstieg der Laktotransferrin-Expression in ins Auge transmigrierten  $CD4^+$  T-Zellen unterstreicht erneut die herausragende Wichtigkeit dieser Zellpopulation für die Pathogenese der ERU, bei der vorrangig  $CD4^+$  Lymphozyten ins Auge transmigrieren (Regan et al. 2012). Laktotransferrin ist ein vor allem von mucosalen Epithelzellen sekretiertes Protein, welches auch in den

Granula neutrophiler Granulozyten vorkommt (Actor et al. 2009). Es besitzt eine bakterizide Wirkung, indem es direkt an Lipopolysaccharid (LPS), einen Bestandteil bakterieller Membranen, bindet (Actor et al. 2009). In septischen Mäusen, bei denen unter Therapie mit Laktotransferrin eine 100-fache Reduktion zirkulierender *E. coli*-Bakterien gegenüber unbehandelten septischen Kontrollen festzustellen war, zeigte sich dieser bakterizide Effekt deutlich (Actor et al. 2009). Zum anderen wirkt Laktotransferrin bakteriostatisch, da es das sowohl für ein- als auch für mehrzellige Organismen lebenswichtige Eisen bindet und so für pathogene Mikroorganismen, wie beispielsweise *Staphylococcus aureus*, unzugänglich machen kann (Pieracci and Barie 2005, Williams and Griffiths 1992). Des Weiteren reduzierte die Eisensequestration durch Laktotransferrin in *in vitro*-Modellen die Bildung reaktiver O<sub>2</sub>-Spezies, was die Zytokinantwort auf den eigentlichen Initiator des Entzündungsreizes spezifizierte, und die Reaktion auf Gewebeschäden, die lediglich unspezifisch aus diesem Reiz resultierten, geringer ausfallen ließ (Kruzel et al. 2010, Kruzel et al. 2006). Zudem konnte in humanen Jurkat-T-Zellen gezeigt werden, dass Laktotransferrin bei Mitogenstimulation von CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> T-Zellen die Differenzierung zu CD4<sup>+</sup> T-Zellen begünstigt (Dhennin-Duthille et al. 2000) und deren Aktivierung induziert, die beispielsweise durch verstärkte Expression von Integrinen wie LFA-1 gekennzeichnet ist (Zimecki et al. 1999). Laktotransferrin war also in diesen Studien, wie auch in einem Versuch an Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus*-infizierten Mäusen, in denen sich durch Laktotransferrin-Applikation die Produktion von Interleukin (IL)-17 und IL-6 verringerte und die von Interferon (IFN)  $\gamma$  und IL-2 gesteigert wurde (Hwang et al. 2014), dazu in der Lage, Antigen-induzierte Entzündung zu limitieren ohne dabei die Immunantwort völlig auszuschalten. Die stark erhöhte Expression von Laktotransferrin in VL von ERU-Patienten deutet also möglicherweise wie schon die ebenso regulierte Septin7-Expression darauf hin, dass es sich bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Zellen um T<sub>reg</sub> handeln könnte. Da bisher eine Expression von Laktotransferrin durch Lymphozyten nicht beschrieben wurde (PubMed-Recherche Stand 16.3.15), und in anderen Studien nur Endothelzellen und neutrophile Granulozyten mit der Laktotransferrin-Synthese assoziiert werden konnten (Actor et al. 2009, Kruzel et al. 2010), ist es möglich, wenn auch nicht sonderlich wahrscheinlich, dass das in unseren Versuchen im Proteom von Lymphozyten des Pferdes festgestellte Laktotransferrin an Rezeptoren auf der Oberfläche der untersuchten Zellen gekoppelt war und nicht primär von diesen

synthetisiert wurde. Möglicherweise erfolgte durch die Bindung von Laktotransferrin an spezifische Rezeptoren auf der T-Zell-Oberfläche, wie sie in Jurkat-Zellen nachgewiesen werden konnten (Tanaka et al. 2004), eine Umwandlung autoaggressiver  $T_H1$ - und  $T_H17$ -Zellen in  $T_{reg}$ , wodurch der Entzündungsschub in die chronische, klinisch weniger auffällige oder inapparente Phase überging. Die Untersuchung der Expression von Laktotransferrin in Lymphozyten des Pferdes auf RNA-Ebene mittels PCR könnte darüber Aufschluss geben, ob das Protein in diesem Versuch als primäres Syntheseprodukt der Lymphozyten oder als Bindungspartner von Laktotransferrin-Rezeptoren auf deren Oberfläche identifiziert wurde. Weitere Einblicke in die Rolle von Laktotransferrin bei der Entstehung der ERU und deren Übergang von der akuten in die chronische Phase könnten künftig durch Doppelfärbungen von ins Auge transmigrierten Lymphozyten mit einem Antikörper gegen Laktotransferrin und einem gegen Forkhead Box P3 (FoxP3), einem  $T_{reg}$ -Marker; sowie gegen Laktotransferrin und die Marker der verschiedenen  $T_H$ -Antworten, vorrangig IFN $\gamma$  und IL-17, und anschließende Durchflusszytometrie gewonnen werden. Zudem wäre es von großer Relevanz, auch intraokuläre Zellen während akuter Entzündungsschübe, zum Beispiel aus enukleierten uveitischen Augen oder aus solchen von im Uveitis-Schub getöteten Pferden, zu gewinnen und vergleichende Untersuchungen zu dort auftretenden  $T_H$ -Antworten durchzuführen.

Septin7 und seine Interaktoren, die in dieser Arbeit einer eingehenderen Untersuchung unterzogen worden sind, stellen möglicherweise Schlüsselemente in der Erforschung der Pathogenese der ERU dar. Die Identifikation von Septin7 als bei der ERU differentiell reguliertes Protein erfolgte in einer früheren Studie unserer Arbeitsgruppe mittels der 2D-DIGE-Technik mit anschließender massenspektrometrischer Analyse einzelner Gelspots (Degroote et al. 2014). Diese Technik eignete sich allerdings nicht für die spezifische Untersuchung von Membranproteinen, da diese auf Grund verschiedener Eigenschaften, die sie von zytosolischen Proteinen abgrenzen, darunter vor allem ihrer schlechten Löslichkeit in bei der Gelelektrophorese verwendeten Puffern, nicht zufriedenstellend in SDS-Gelen aufgetrennt werden (Santoni et al. 2000). Membranproteine stellen jedoch eine immunologisch hoch interessante Gruppe dar, zu der wichtige Immunregulatoren, wie Integrine und Zytokinrezeptoren zählen. Diese Arbeit war deshalb insbesondere auch der Untersuchung differentiell regulierter Oberflächenproteine auf peripheren und intraokulären Lymphozyten bei der ERU



gewidmet. Als nächstes wurde also nach Extraktion dieser Fraktion mittels Oberflächenbiotinylierung der Zellen das differentielle Plasmamembranproteom peripherer und intraokulärer Lymphozyten des Pferdes bei der ERU mittels differentieller Proteomanalyse und Massenspektrometrie untersucht. Unseres Wissens handelt es sich hierbei um die Erstbeschreibung eines Vergleichs des Plasmamembranproteoms peripherer und zum Zielorgan transmigrierter Zellen des gleichen Individuums (PubMed-Recherche Stand 16.3.2015). Wir konnten insgesamt 146 Proteine identifizieren, die zwischen peripheren Lymphozyten und ins Auge transmigrierten Zellen mindestens um den Faktor 2 differentiell reguliert waren (Tab. 4.4 und 4.5). Davon waren 109 Plasmamembranproteine, was einem Anteil von 75% entspricht und die ausgezeichnete Anreicherung dieser Proteine durch die hier verwendete Extraktion nach Oberflächenbiotinylierung zeigt.

Von den 146 differentiell regulierten Proteinen waren 70 in peripheren Lymphozyten und 76 in intraokulären Zellen des ERU-Tieres stärker exprimiert. Bei der Genomatrix-Analyse der wichtigsten Signalwege, an denen die humanen Orthologe der differentiell regulierten Pferdeproteine jeweils beteiligt sind, fiel auf, dass sowohl in peripheren als auch in intraokulären Lymphozyten beispielsweise Proteine der Signalwege „Immune Response“, „Leukocyte Activation“ und „Response to Stress“ hochreguliert waren. Da das Spendertier an einer chronisch-entzündlichen Autoimmunerkrankung litt, war dies zu erwarten. Interessanterweise gab es jedoch auch gravierende Unterschiede bei den Signalwegen der differentiell regulierten Proteine. So exprimierten periphere Zellen außerdem vermehrt Proteine von Signalwegen wie „Activation of Immune Response“, „Intermediate Filament Cytoskeleton Organization“ und „Cell Junction Assembly“, was auf die Vorbereitung der Invasion des entzündeten Gewebes hindeutete. In vitrealen Leukozyten waren hingegen vor allem Proteine T-Zell-spezifischer Signalwege hochreguliert, wie beispielsweise „T Cell Proliferation“, „T Cell Costimulation“ und „Cytokine Biosynthetic Process“. Diese Signalwege könnten darauf hinweisen, dass die bereits transmigrierten Leukozyten einen stärkeren Differenzierungsgrad aufgewiesen und spezifisch Zytokine produziert haben könnten.

Zu den in peripheren Lymphozyten stärker exprimierten Proteinen gehörte beispielsweise die Integrin-Untereinheit  $\beta 1$  (CD29; Tab. 4.4, Nr. 69), welche sich unter anderem für die Adhäsion humaner, unstimulierter T-Lymphozyten an Endothelzellen unverzichtbar zeigte (Fiorini et al. 2000). Integrine spielen eine

überaus wichtige Rolle bei der Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen und Mitglieder der verschiedenen Subfamilien interagieren miteinander bei der Transduktion inflammatorischer Signale (Uotila et al. 2014). So ist das Integrin VLA-4, welches aus den Untereinheiten  $\alpha 4$  und  $\beta 1$  besteht, gemeinsam mit seinem Liganden auf Endothelzellen, Vascular Cell Adhesion Molecule (VCAM)-1, für das in Blutstromrichtung gerichtete Rolling zuständig (Dominguez and Hammer 2014). LFA-4, das sich aus einer  $\alpha 1$ - und einer  $\beta 2$ -Untereinheit zusammensetzt, vermittelt hingegen durch seine Interaktion mit Intercellular Adhesion Molecule (ICAM)-1 das Rolling gegen den Strom (Dominguez and Hammer 2014). Nur das Zusammenspiel dieser beiden und weiterer Integrine gewährleistet also die erfolgreiche Suche nach einer adäquaten Transmigrationsstelle am Endothel (Dominguez and Hammer 2014). Die vermehrte Expression von CD29 in peripheren Blutzellen gegenüber intraokulären Leukozyten spricht also dafür, dass bereits transmigrierte Zellen die Synthese von Proteinen, die Funktionen bei der Initiation der Transmigration haben, zu Gunsten anderer Signalwege verringern.

Ein weiteres Protein, welches Blutlymphozyten stärker exprimierten als ins Auge gewanderte Zellen, ist CD226 (Tab. 4.4, Nr. 59). CD226 zeigte sich als wichtiger Regulator der Balance zwischen  $T_h1$ -/ $T_h17$ - und  $T_h2$ -Zellen in menschlichen primären T-Zellen, in denen eine Blockade von CD226 durch monoklonale Antikörper zur Inhibition der T-Zell-Aktivierung und –Proliferation, sowie zu signifikant verringerter Sekretion von IFN $\gamma$  und IL-17 führte (Lozano et al. 2013). In einer Studie an Mäusen konnte des Weiteren gezeigt werden, dass der Effekt der  $T_h1$ -/ $T_h17$ -Induktion durch erhöhte Expression von CD226 eng mit einer damit verbundenen Suppression regulatorischer T-Zellen zusammenhing (Koyama et al. 2013). Der Knock-out von CD226 in  $T_{reg}$  von an Leukämie erkrankten Mäusen verbesserte deren regulatorische Kapazität bezüglich der IFN $\gamma$ -Produktion durch  $CD4^+$  Effektorzellen. Die im vorliegenden Proteomics-Experiment zu differentiell regulierten Proteinen auf der Oberfläche equiner peripherer und intraokulärer Lymphozyten bei der ERU festgestellte, vergleichsweise höhere CD226-Expression in peripheren Lymphozyten könnte im Umkehrschluss wiederum auf eine gesteigerte intraokuläre  $T_{reg}$ -Aktivität schließen lassen.

CD90, ein Oberflächenprotein, das von unserer Arbeitsgruppe bereits als Interaktor eines wichtigen Integrinaktivators, Talin1, auf peripheren und intraokulären Granulozyten identifiziert worden war (Degroote et al. 2013), konnte in diesem

Experiment auch auf Lymphozyten nachgewiesen werden und war auf diesen Zellen ebenfalls in peripheren Zellen stärker exprimiert (Tab. 4.4, Nr. 57). Die Rolle von CD90 bei der Aktivierung von T-Lymphozyten wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten entweder einen stimulierenden oder einen inhibitorischen Effekt der Bindung von gegen CD90 gerichteten Antikörpern an T-Zellen feststellen (Conrad et al. 2009, Nishida et al. 2011). Die CD90-vermittelten Mechanismen zur Regulation der Aktivität von T-Zellen laufen jedoch in beiden Fällen unter Beteiligung des T-Zell-Rezeptor (TCR)/CD3-Komplexes ab (Conrad et al. 2009, Nishida et al. 2011). Dieser wird bei der natürlichen Aktivierung von T-Zellen von deren Oberfläche ins Zellinnere endozytiert und damit funktionell deaktiviert (Valitutti et al. 1995). In einer klinischen Studie an Menschen mit Diabetes mellitus Typ I wurde jedoch gezeigt, dass eine künstliche Deaktivierung des TCR/CD3-Komplexes mittels monoklonaler anti-CD3-Antikörper, im Gegensatz zur natürlichen Endozytose des TCR/CD3-Komplexes, die Aktivierung der Zelle sogar verhindern kann (Keymeulen et al. 2005). Die Beteiligung von CD90 an der T-Zell-Aktivierung ist also offenbar von komplexen Mechanismen reguliert, die bisher nicht aufgeklärt werden konnten. Seine Rolle bei der Extravasation von Leukozyten ist hingegen weniger kontrovers. An CD90-defizienten Mäusen mit verschiedenen entzündlichen Erkrankungen, wie Peritonitis, akuten oder chronischen Pneumonien, konnte festgestellt werden, dass CD90 die Extravasation von Entzündungszellen und deren Invasion in entzündetes Gewebe unterstützt (Schubert et al. 2011). Die Zahl der transmigrierten Granulozyten und Monozyten nahm in CD90-Knock-out-Mäusen deutlich ab (Schubert et al. 2011). Allerdings hatte diese Manipulation der CD90-Expression keine Auswirkungen auf das Transmigrationsverhalten von T-Zellen, die nicht vermehrt wanderten, wenn sie als einzige Leukozytenpopulation noch CD90 exprimierten (Schubert et al. 2011). Welche Rolle die in Granulozyten (Degroote et al. 2013) und Lymphozyten festgestellte differentielle Regulation von CD90 bei der Pathogenese der ERU spielt, sollte in zukünftigen Studien evaluiert werden. Hierzu wären zuerst Versuche zur Wirkung einer Bindung von anti-CD90-Antikörpern auf die Aktivierung von T-Zellen des Pferdes notwendig, mit deren Hilfe beleuchtet werden könnte, ob die CD90-Bindung beim Pferd die Expression von Aktivierungsmarkern, wie CD69 oder CD70, verringert oder erhöht, ob es also eine Aktivierungshemmende oder –stimulierende Wirkung auf T-Lymphozyten dieser Spezies hat. Auf Grundlage dieser neuen Informationen könnten im Anschluss Silencing- oder Knock-

Out-Versuche in Verbindung mit Transmigrationsassays mit stimulierten T-Zellen durchgeführt werden, um die Rolle von CD90 für die Transmigration von Lymphozyten bei der ERU eingehender zu charakterisieren.

Interessanterweise waren in den beiden Zellproben des untersuchten ERU-Patienten außerdem drei desmosomale Proteine, Desmoplakin, Desmoglein1 und Plakophilin1, differentiell reguliert (Tab. 4.4, Nr. 9, 14, 26 und 47). Desmosomen sind starke interzelluläre Verbindungen, die vor allem im Herzmuskel und in der Haut vorkommen. Sie bestehen aus desmosomalen Cadherinen, zu denen unter anderem Desmoglein1 (Tab 4.4, Nr. 26) zählt, sowie aus Plakophilin (Tab 4.4, Nr. 47), Plakoglobin und Desmoplakin (Tab 4.4, Nr. 9 und 14), welche die Verbindung zwischen den Cadherinen und zytoskelettalen Intermediärfilamenten herstellen (Broussard et al. 2015). Unseres Wissens gibt es bisher keine Untersuchungen, die Desmosomen bei Lymphozyten oder anderen Blutzellen charakterisieren (PubMed-Recherche Stand 16.3.15), so dass die Identifikation dieser Proteine in den equinen Lymphozytenproben höchst überraschend ist und weiterer Analyse bedarf. Sie unterstreicht jedoch erneut die ausgezeichnete Anreicherung von Membranproteinen durch die Oberflächenbiotinylierung, da am Beispiel der drei desmosomalen Proteine deutlich wird, dass hier identifizierte intrazelluläre Proteine, wie Plakophilin1 und Desmoplakin, in physischem Zusammenhang mit Membranproteinen stehen, die durch diese Methode angereichert wurden, so hier zu Desmoglein1. Dadurch könnten wir in Zukunft möglicherweise schon auf Grund der Proteinzusammensetzung der Probe nach Oberflächenanreicherung wichtige Hinweise auf mögliche Protein-Protein-Interaktionen erhalten.

Zu den in vitrealen Zellen stärker exprimierten Proteinen gehörten die T-Zell-Ko-Stimulatoren CD28 (Tab. 4.5, Nr. 35) und CD80 (Tab. 4.5, Nr. 51). CD80 ist ein Rezeptor für verschiedene Liganden, darunter CD28 und Cytotoxic T Lymphocyte-associated Antigen (CTLA)-4, welche jeweils unterschiedliche Signale auslösen können (Dilek et al. 2013, Haanstra et al. 2015, Poirier et al. 2010). Die selektive Antagonisierung von CD28, das somit nicht mehr an CD80 binden konnte, verursachte beispielsweise in humanen T-Zellen *in vitro* (Dilek et al. 2013), in Transplantationsmodellen (Poirier et al. 2010) sowie bei experimenteller autoimmuner Enzephalomyelitis, dem Modell für Multiple Sklerose, bei nicht-humanen Primaten (Haanstra et al. 2015) eine Verstärkung der T<sub>reg</sub>- und Abschwächung der Effektor-T-Zellaktivierung. Im Gegensatz dazu unterstützte die

Bindung von CTLA-4 an CD80 die Induktion von T<sub>reg</sub> im Transplantationsmodell und schaffte so die Voraussetzungen für ein verlängertes Überleben des Transplantats im Empfängertier (Poirier et al. 2010). Die Interaktion von CD80 und CD28 wurde bei der Spezies Pferd bisher nicht untersucht (PubMed-Recherche Stand 16.3.2015). Da die Aktivierung von CD80 in anderen Spezies je nach bindendem Liganden die Balance zwischen T<sub>reg</sub> und Effektor-T-Zellen in beide Richtungen modulieren kann (Dilek et al. 2013, Poirier et al. 2010), deutet sein Auftauchen in Verbindung mit dem Effektorzell-assoziierten Liganden CD28 in der untersuchten Probe möglicherweise auf eine Verschiebung dieser Balance hin zur vermehrten Differenzierung von Effektorzellen zum Zeitpunkt der Pars plana Vitrektomie bei diesem Pferd hin. Dies könnte ein Hinweis auf einen sich anbahnenden neuen Uveitis-Schub sein. In künftigen Untersuchungen sollte die CD28/CD80-Expression auf VL an einer größeren Zahl von Pferden mit ERU untersucht werden, um daraus eventuell eine Assoziation dieser mit dem klinischen Stadium der Erkrankung ableiten zu können, was möglicherweise auch prognostischen Wert besitzt.

Das ebenso auf vitrealen Leukozyten bei der ERU vermehrt exprimierte Protein P2X-Purinorezeptor (Tab. 4.5, Nr. 21), das hier ebenfalls erstmals in equinen Lymphozyten beschrieben wurde, stimulierte die Aktivierung des Proteins NOD-like Receptor Family, Pyrin Domain Containing (NLRP) 3 sowohl in Mäusen, bei denen Cisplatin-induzierte Nierenschädigungen aufgetreten waren (Zhang et al. 2014), als auch in solchen mit degenerativen Veränderungen am RPE (Kerur et al. 2013). NLRP3, ein Bestandteil des angeborenen Immunsystems, aktiviert das Enzym Caspase1 und vermittelt so die Sekretion verschiedener Zytokine, vor allem IL-1 $\beta$  (Rathinam et al. 2012). Auf diese Weise kann NLRP3 die Reaktion auf viele verschiedene intrazelluläre Noxen beeinflussen (Rathinam et al. 2012). IL-1 $\beta$  ist außerdem ein wichtiges Signalmolekül bei der Entstehung einer Reihe immunmediierter Erkrankungen, vor allem von Autoimmunkrankheiten des Menschen (Abderrazak et al. 2015). Bestimmte Mutationen von humanem NLRP3 führten zu Hyperaktivität des Proteins und zu konstitutiver IL-1 $\beta$ -Sekretion, die je nach Lokalisation der Mutation unterschiedliche Formen des erblichen periodischen Fiebers, einer humanen Autoimmunerkrankung, verursachten (Masters et al. 2006). Da es sich unseres Wissens bei der vorliegenden Arbeit um die Erstbeschreibung des P2X-Purinorezeptors beim Pferd handelt (PubMed-Recherche Stand 16.3.2015), sind die bei der ERU ablaufenden Mechanismen, an denen der P2X-Purinorezeptor

beteiligt sein könnte, trotz ihrer möglichen hohen Relevanz für die Pathogenese dieser Autoimmunerkrankung, noch gänzlich unerforscht. Die Identifikation des P2X-Purinorezeptors als in VL stärker exprimiertes Protein ist ein interessanter erster Befund. In zukünftigen Untersuchungen sollte nun zunächst betrachtet werden, ob sich diese differentielle Regulation in peripheren und intraokulären Lymphozyten von anderen ERU-Pferden bestätigen lässt und welche funktionelle Bedeutung diese haben könnte. Dies wäre beispielsweise durch Transfektionsversuche möglich.

Ein weiteres auf VL stärker exprimiertes Protein, Single Immunoglobulin and Toll-Interleukin 1 Receptor (SIGIRR) (Tab. 4.5, Nr. 16), ist ein negativer Regulator TLR2-mediierter Entzündungen, wie beispielsweise bei der Meningitis im Mausmodell nachgewiesen wurde (Costello et al. 2015). Der TLR2-Agonist Peptidoglycan stimulierte bei Mäusen mit experimentell induzierter Autoimmunuveitis dendritische Zellen zur Induktion der T<sub>H</sub>17-Antwort, und trug so einschlägig zur Pathogenese der EAU bei (Wei et al. 2014). Die negative Regulation der TLR2-Kaskade wurde in einem Mausmodell der invasiven Lungenaspergillose durch die Bindung von IL-37 an SIGIRR vermittelt (Moretti et al. 2014). IL-37 reduzierte dort auf diesem Weg die Sekretion von IL-17 und die Aktivierung von T<sub>H</sub>17-Zellen, nahm also Einfluss auf das erworbene Immunsystem, dämpfte aber ebenfalls die NLRP3-Inflammasomaktivierung, die Teil des angeborenen Immunsystems ist (Moretti et al. 2014). Der Rezeptor SIGIRR könnte also auch bei der ERU wichtige Funktionen bei der Interaktion von angeborenem und erworbenem Immunsystem haben und seine stärkere Expression auf VL weist erneut auf eine vorrangig regulatorische Funktion dieser Zellen im hier untersuchten Stadium der ERU hin.

Ein funktionell besonders interessantes Protein, das im proteomischen Experiment auf VL des untersuchten ERU-Tieres stärker exprimiert war, ist CD150 (Tab. 4.5, Nr. 46). Die durchflusszytometrische Analyse der CD150-Expression auf peripheren Blut- und intraokulären Lymphozyten von 14 ERU-Pferden bestätigte den Anstieg von CD150 in VL (Abb. 4.19 A und B). Die Expression war in diesen Zellen gegenüber peripheren Lymphozyten der gleichen Tiere höchst signifikant um etwa das Fünffache gesteigert (Abb. 4.19 B). Diese überaus deutliche differentielle Regulation könnte ein Hinweis auf eine wichtige Rolle von CD150 bei der ERU sein. Eine vermehrte Expression von CD150 wurde auch in T-Zellen im Mausmodell des systemischen Lupus erythematosus (Shai et al. 1999) und in solchen von MS-Patienten (Ferrante et al. 1998) festgestellt, was eine Bedeutung von CD150 auch für

die Pathogenese anderer Autoimmunerkrankungen als der ERU impliziert. CD150, auch als Signaling Lymphocyte Activation Molecule (SLAM) bezeichnet, erfüllt gemeinsam mit seinen Effektormolekülen, unter anderem SLAM-associated Protein (SAP) und der Protein Tyrosin Kinase FynT, zahlreiche Funktionen bei der Regulation des angeborenen und des erworbenen Immunsystems (Calpe et al. 2008, Veillette et al. 2007). CD150 gehört einer Gruppe von Rezeptoren an, die in die Immunglobulin-Superfamilie eingeordnet werden (Vilar et al. 2011). Diese Familie reguliert die Funktion von B- und T-Lymphozyten, sowie Zellen des angeborenen Immunsystems (Vilar et al. 2011). An einer Mäuse-T-Zelllinie konnte der Nachweis erbracht werden, dass die zytoplasmatische Domäne von CD150 konstitutiv mit SAP assoziiert ist (Chen et al. 2006). SAP erfuhr bei Ligandenbindung durch die extrazelluläre Bindungsstelle von CD150 eine Konformationsänderung und band daraufhin die Kinase FynT, welche so aktiviert wurde (Chen et al. 2006). Initiiert durch FynT konnten verschiedene Phosphorylierungsprozesse im weiteren Verlauf die Induktion des  $T_H2$ -Transkriptionsfaktors GATA-3 und in Folge dessen die vermehrte Expression von IL-4 und die Dämpfung der IFN $\gamma$ -Sekretion bewirken, was im Mausmodell zur X-Chromsom assoziierten, lymphoproliferativen Krankheit von Menschen mit Mutationen im Gen für SAP gezeigt werden konnte (Cannons et al. 2004). GATA-3 unterdrückte dabei die  $T_H1$ -Antwort, repräsentiert durch die verringerte IFN $\gamma$ -Produktion, auf mehreren Wegen. Zum einen konnte in primären humanen T-Zellen bestätigt werden, dass eine gesteigerte GATA-3-Expression direkt mit der Verringerung der Transkription des Gens für IFN $\gamma$  einhergeht (Jenner et al. 2009). Zum anderen reduzierte sich in solchen Zellen durch die Expressionssteigerung von IL-13, eines Zytokins der  $T_H2$ -Antwort, das ebenfalls durch GATA-3 induziert wird, die IL-12-Ausschüttung (Bourreau et al. 2001). Die IL-12-medierte  $T_H1$ -Differenzierung wurde dadurch gedämpft (Bourreau et al. 2001). Der CD150/SAP/FynT-Pfad zur Aktivierung des  $T_H2$ -Transkriptionsfaktors GATA-3 spielt also in anderen Spezies eine zentrale Rolle bei der Unterdrückung der  $T_H1$ -Antwort (Davidson et al. 2004, Ma et al. 2007), was auch in VL von ERU-Pferden in der klinisch unauffälligen Phase der Erkrankung eine Rolle spielen könnte. Interessanterweise wurde in einer Studie an primären humanen T-Zellen festgestellt, dass die Expression der CD150-Verwandten SLAMF3 und SLAMF6 beim systemischen Lupus erythematosus mit der Schwere des Krankheitsgeschehen korreliert und eine Ko-Stimulation von TCR/CD3-aktivierten T-Zellen durch eines

oder beide dieser Proteine einen Anstieg der IL-17-Expression induziert (Chatterjee et al. 2012). Diese beiden Mitglieder der SLAM-Familie sind für die Spezies Pferd bisher nicht beschrieben (PubMed-Recherche Stand 16.3.2015) und auch die Rolle der erhöhten Expression von CD150, die in dieser Arbeit auf intraokulären Lymphozyten von ERU-Pferden festgestellt werden konnte, ist bisher ungeklärt. Da IL-17-sekretierende T<sub>H</sub>17-Zellen aber bei der ERU, wie auch bei einer Reihe anderer Autoimmunerkrankungen (Cua et al. 2003, Kim et al. 2010), möglicherweise eine tragende Rolle spielen, könnte die Charakterisierung der Funktionen von CD150 und weiterer Mitglieder der SLAM-Familie beim Pferd maßgeblich zur Aufklärung beteiligter Pathomechanismen beitragen. Dazu könnten beispielsweise Transmigrationsassays mit CD150-geilencten oder CD150-Knock-Out-Zellen durchgeführt werden. Auch die Untersuchung von CD150<sup>-/-</sup>-Zellen hinsichtlich der Expression der Transkriptionsfaktoren für die T<sub>H</sub>2- und T<sub>H</sub>17-Antwort, GATA-3 (Li et al. 2015) und RORγt (Solt et al. 2015) könnte wertvolle Einblicke in die tatsächlichen CD150-assoziierten Mechanismen bei der ERU-geben.

Die proteomische Untersuchung peripherer und intraokulärer Lymphozyten bei der ERU ergab noch ein weiteres Protein von möglicher großer funktioneller Relevanz für diese Krankheit. Es handelte sich dabei um CD166 (Tab. 4.5, Nr. 31), das sogenannte Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule (ALCAM). CD166 wurde bisher auf equinen Lymphozyten nicht beschrieben (PubMed-Recherche Stand 16.3.2015). Die durchflusszytometrische Untersuchung der Zellen von 14 weiteren ERU-Pferden bestätigte jedoch die vermehrte Expression in vitrealen Lymphozyten der ERU-Tiere im Vergleich zu peripheren Lymphozyten (Abb. 4.19 C und D). Die MFI von CD166 war in VL signifikant um den Faktor 1,8 gegenüber peripheren Zellen erhöht (Abb. 4.19 D). Auf Grund sehr geringer Zellzahlen in den hier untersuchten VL-Proben konnte eine genaue Untersuchung der CD166-Expression in Subpopulationen intraokulärer Lymphozyten bislang allerdings noch nicht vorgenommen werden. Beim Menschen war die CD166-Expression auf CD4<sup>+</sup> peripheren Lymphozyten weitaus geringer als auf B-Zellen (Cayrol et al. 2008). Sollte dies auch beim Pferd der Fall sein, wäre eine mögliche Erklärung für die erhöhte Gesamtexpression auf Lymphozyten im Auge von ERU-Pferden, dass die gewanderten CD4<sup>+</sup> Zellen CD166 stärker exprimieren als die peripheren CD4<sup>+</sup> Lymphozyten, da der Anteil an CD4<sup>+</sup> Zellen im Auge von ERU-Patienten im Verhältnis zu dem der B-Zellen höher ist als peripher (Deeg et al. 2001, Gilger et al.



1999, Regan et al. 2012, Romeike et al. 1998). Jedoch sind zur Bestätigung dieser Hypothese dringend Untersuchungen an weiteren VL-Proben mit größerer Zellzahl erforderlich, die eine Bestimmung der CD166-exprimierenden Subpopulationen zulassen. Funktionell stellt CD166 als Rezeptor für das ko-stimulatorisch auf die TCR/CD3-mediierte T-Zellaktivierung wirkende Molekül CD6 (Nair et al. 2010) einen hoch interessanten Kandidaten dar. Es konnte gezeigt werden, dass CD166 sowohl homotypische Bindungen zu anderen CD166-Molekülen als auch heterotypische Bindungen mit seinem Liganden CD6 eingeht (Cayrol et al. 2008, Zimmerman et al. 2006). Die Blockade von CD6 durch einen nicht stimulatorisch wirkenden monoklonalen Antikörper reduzierte in primären humanen Lymphozyten die Expression von Zellaktivierungsmarkern, wie CD25, und verringerte die Sekretion proinflammatorischer, mit der T<sub>h</sub>1-Antwort assoziierter Zytokine (Nair et al. 2010). Im umgekehrten Fall nahm die Transkription von IFN $\gamma$  und IL-2, den Markerzytokinen der T<sub>h</sub>1-Antwort, bei gleichzeitiger Stimulation von CD3 und CD6 gegenüber der reinen CD3-Stimulation zu (Nair et al. 2010). Sowohl auf primären humanen Lymphozyten als auch auf Jurkat-T-Zellen wurde auf diese Weise bestätigt, dass die Bindung von CD166 an seinen Liganden CD6 bei der Bildung immunologischer Synapsen zwischen APC und T-Zellen eine Verstärkung der T<sub>h</sub>1-Antwort zur Folge hat (Nair et al. 2010, Zimmerman et al. 2006). Interessanterweise war auch CD6 unter den proteomisch auf peripheren und intraokulären Zellen identifizierten Proteinen, jedoch war seine Expression bei dem hier untersuchten Tier auf peripheren Lymphozyten stärker als auf den transmigrierten Zellen (Tab. 4.4, Nr. 27). Die Bindungspartner CD166 und CD6 waren also auf der Oberfläche der peripheren und intraokulären Lymphozyten dieses ERU-Pferdes unterschiedlich reguliert. Eine voneinander abweichende Regulation der beiden Proteine zwischen verschiedenen Zellen eines Patienten bei anderen Erkrankungen ist in der Literatur bisher nicht beschrieben (PubMed-Recherche Stand 16.3.2015). Ihre Feststellung bei Zellen eines ERU-Patienten ist allerdings höchst interessant, da die erhöhte Expression von CD166 auf VL ohne gleichzeitigen Anstieg der CD6-Expression ein Hinweis darauf sein könnte, dass homotypische Bindungen zwischen zwei CD166-Molekülen in ins Auge transmigrierten Zellen größere Relevanz besitzen als in peripheren Lymphozyten. Diese Interaktion und der sich daraus ergebende Signalweg ist jedoch bisher nur unzureichend charakterisiert; es ist lediglich bekannt, dass solche homotypischen Bindungen zwischen menschlichen Zellen möglich sind (Cayrol et al.

2008) und dort weniger stabile Verknüpfungen bilden als die Bindung von CD166 an CD6 (Zimmerman et al. 2006). Die Bedeutung solcher Affinitätsunterschiede ist beim Pferd allerdings noch ungeklärt. Möglicherweise werden durch homotypische CD166-Interaktionen zwischen Lymphozyten beim Pferd Signalwege initiiert, die an der Ausprägung eines neuen ERU-Schubes beteiligt sind. Andererseits könnte diese Interaktion in der untersuchten Spezies jedoch auch antiinflammatorische Wirkung haben und zur Unterdrückung der  $T_H1$ - und/oder  $T_H17$ -Antwort der intraokulären Zellen beitragen. Zur Aufklärung der molekularen Mechanismen sind weitere Versuche zu den Auswirkungen homo- und heterotypischer CD166-Bindungen beim Pferd erforderlich. Die heterotypische Interaktion von CD166 und CD6 ist beim Menschen jedoch bereits weitreichender charakterisiert (Nair et al. 2010, Zimmerman et al. 2006). Neben ihren Funktionen bei der Kommunikation zwischen Zellen des Immunsystems, wie der Ko-Stimulation von in Aktivierung begriffenen T-Lymphozyten durch APC (Nair et al. 2010, Zimmerman et al. 2006), ist sie auch an der Transmigration von CD4+ T-Zellen über die Blut-Hirn-Schranke bei der Multiplen Sklerose beteiligt (Cayrol et al. 2008). Um die Rolle von CD166 bei der Transmigration der BRS durch Lymphozyten bei ERU-Patienten zu charakterisieren, inkubierten wir also im nächsten Versuch periphere Blutlymphozyten eines gesunden Pferdes mit einem monoklonalen anti-CD166-Antikörper oder entsprechendem Kontrollantikörper. Die Transmigrationseigenschaften der so präinkubierten Lymphozyten über gesunde, kultivierte equine RPE-Zellen wurden anschließend mit denen unbehandelter Lymphozyten des gleichen Tieres verglichen. Dabei wurde deutlich, dass die Bindung des anti-CD166-Antikörpers eine Reduktion der Transmigrationsfähigkeit der Zellen dieses Tieres um 50% bewirkte (Abb. 4.20). Damit konnte erstmals belegt werden, dass CD166 Einfluss auf die Interaktion von Lymphozyten des Pferdes mit Zellen der equinen BRS nimmt. Die genauen Mechanismen dessen und eine eventuelle Beteiligung von CD6 daran müssen in Zukunft weiter charakterisiert werden, da auch denkbar wäre, dass der hier verwendete Antikörper CD166 auf equinen Lymphozyten nicht blockierte, sondern aktivierte. Zur Überprüfung dessen könnte CD166 mittels RNA-Interferenz gesilencet und der Transmigrationsversuch mit den so behandelten Zellen wiederholt werden. Da dieses präliminäre Experiment außerdem lediglich an Zellen eines Pferdes durchgeführt wurde, kann noch keine endgültige Aussage zur biologischen Relevanz des Ergebnisses getroffen werden. Es bildet allerdings die Grundlage für weitere

Studien zur Rolle von CD166 bei der Pathogenese der ERU. Beispielsweise könnte im Hinblick auf die komplexen pathophysiologischen Vorgänge bei der ERU ein Transfektionsversuch von CD166 auf gesunde Lymphozyten oder solche von ERU-Patienten mit anschließendem erneutem Transmigrationsassay über RPE-Zellen aus gesunden und uveitischen Augen weiteren Einblick in die Bedeutung der erhöhten CD166-Expression auf intraokulären Lymphozyten von ERU-Patienten geben. Diese und weitere Untersuchungen sollten in Zukunft durchgeführt werden, um die funktionelle Bedeutung der differentiellen Regulation von CD166 und CD6 sowie deren Rolle bei der Entstehung der autoimmunmedierten Uveitis des Pferdes aufzuklären.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten mittels eigens dafür hergestellter monoklonaler, pferdespezifischer Antikörper wertvolle Erkenntnisse über die differentielle Regulation von Septin7 auf Lymphozyten von ERU-Patienten und augengesunden Kontrollpferden gesammelt werden. Es wurde gezeigt, dass Septin7 ein Teil eines komplexen Netzwerks interagierender Proteine ist, von denen vielen eine Schlüsselrolle bei der Pathogenese dieser wichtigen Pferdekrankheit zukommen könnte. Des Weiteren wurden in einer proteomischen Studie insgesamt 146 Oberflächenproteine mit differentieller Regulation zwischen peripheren und intraokulären Lymphozyten bei ERU-Pferden identifiziert und teilweise näher charakterisiert, wobei interessante und pathophysiologisch möglicherweise hoch relevante Einsichten gewonnen werden konnten. Die durch diese Arbeit gesammelten Erkenntnisse sind ein wichtiger Schritt hin zur Aufklärung der Pathomechanismen der ERU, welche mit einer Prävalenz von etwa 10% (Schwink 1992) die häufigste Ursache für Erblindung beim Pferd darstellt (Gilger et al. 2010) und sich außerdem als einzige spontan auftretende autoimmune Uveitis im Tierreich als außerordentlich gutes Modell für die humane Autoimmunuveitis eignet.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Die equine rezidivierende Uveitis (ERU) ist eine häufig in der Pferdepopulation auftretende Autoimmunerkrankung, bei der schubweise autoaggressive T-Lymphozyten das Auge infiltrieren. Dort führen sie zu entzündlichen Veränderungen an der Netzhaut, die in letzter Konsequenz eine Erblindung des betroffenen Auges verursachen. Das Ziel dieser Arbeit war es, Proteine, die auf ins Auge transmigrierten Lymphozyten im Vergleich zu peripheren Lymphozyten differentiell exprimiert sind, zu charakterisieren um dadurch zur Aufklärung der Pathogenese der ERU beizutragen. Dabei war das Protein Septin7, welches auf peripheren Blutlymphozyten von an ERU erkrankten Pferden geringer exprimiert ist als auf denen augengesunder Kontrollpferde, von besonderem Interesse, da es eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung des Zytoskeletts spielt und so maßgeblich an der Pathogenese der ERU beteiligt sein könnte.

Zunächst wurden sieben monoklonale Antikörper gegen equines Septin7 hergestellt und in verschiedenen Methoden eingehend auf ihre Eignung zur Detektion dieses wichtigen zytoskelettalen Proteins untersucht. Dabei konnte für die proteinanalytisch relevanten Methoden Western Blot, Durchflusszytometrie, Immunzyto- und -histochemie sowie Immunpräzipitation jeweils mindestens ein sehr gut an equines Septin7 bindender Antikörper identifiziert werden.

Im Anschluss erfolgte die Untersuchung der Expression von Septin7 in Lymphozyten des peripheren Blutes und in aus dem Vitreus gewonnenen Lymphozyten von ERU-Patienten. Dabei ergab sich interessanterweise eine um den Faktor 4,7 verstärkte Expression von Septin7 in intraokulären Zellen gegenüber peripheren Lymphozyten. Die funktionelle Relevanz von Septin7 für die ERU wurde mittels eines Transmigrationsversuchs an Septin7-gesilencten peripheren Blutleukozyten (PBL) überprüft. Dabei zeigte sich eine Steigerung der Transmigrationsrate Septin7-gesilencter Zellen gegenüber Kontrollen um 28%, was auf eine Funktion von Septin7 bei der Transmigration hinweist.

Zum Zweck der weiteren Charakterisierung der Funktion von Septin 7 in Pferde-PBL wurde eine Immunpräzipitation von Septin7 aus diesen Zellen durchgeführt. Die anschließende massenspektrometrische Analyse des Präzipitats ergab 47 Septin7-Interaktoren, die erstmals in Verbindung mit Septin7 in equinen PBL identifiziert werden konnten. Von besonderem funktionellem Interesse darunter waren Vimentin,

ebenfalls ein Protein des Zytoskeletts, und Laktotransferrin, ein vielseitiger Immunmodulator. Die Expression dieser Proteine wurde dann durchflusszytometrisch in peripheren und intraokulären Lymphozyten analysiert. Vimentin war in nur 12 % der Lymphozyten im Auge im Vergleich zu 71% der peripheren Lymphozyten des ERU Pferdes exprimiert, die Expressionsstärke von Laktotransferrin war hingegen signifikant 8,8-fach höher in intraokulären als in peripheren Lymphozyten. Diese Expressionsänderungen vollzogen sich bei beiden Proteinen vorrangig auf CD4<sup>+</sup> Zellen.

Zusätzlich zur näheren Charakterisierung von Septin7 bei Lymphozyten von an ERU erkrankten Pferden lag besonderes Interesse auf der Identifikation differentiell regulierter Oberflächenmembranproteine zwischen peripheren und intraokulären Lymphozyten im Rahmen der ERU. In durch Oberflächenbiotinylierung von peripheren und intraokulären Lymphozyten gewonnenen Proben konnten in einem proteomischen Experiment insgesamt 146 differentiell exprimierte Proteine identifiziert werden, die nie zuvor auf ihre Rolle bei der ERU untersucht worden waren. Die Regulation zweier besonders interessanter Proteine, die auf intraokulären Lymphozyten stärker exprimiert waren, konnte durchflusszytometrisch bestätigt werden. Dabei handelte es sich um CD150, einen Stimulator der TCR-medierten Signalkaskade, und CD166, ein an der T-Zellaktivierung und Leukozytenmigration beteiligtes Rezeptormolekül. Ein Transmigrationsversuch mit CD166-blockierten Zellen bestätigte auch für CD166, wie schon für Septin7, eine mögliche funktionelle Relevanz bei der Pathogenese der ERU.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente ergaben eine Vielzahl interessanter differentiell regulierter Kandidaten bei Lymphozyten von an ERU erkrankten Pferden. Die hier bereits bezüglich ihrer Regulation bei der ERU untersuchten Proteine Vimentin, Laktotransferrin, CD150 und CD166 sollten in Zukunft weiter auf ihre funktionelle Beteiligung an der Pathogenese der ERU untersucht werden. Zusätzlich könnten besonders der Septin7-Interaktor Cdc42, sowie die Oberflächenproteine P2X-Purinorezeptor, SIGIRR und CD6 große funktionellen Bedeutung bei der ERU haben und sollten Gegenstand künftiger Forschung sein, um die Pathogenese der häufigen und schwerwiegenden Erkrankung ERU weiter aufzuklären.

## 7 SUMMARY

Equine recurrent uveitis (ERU) is a frequently occurring autoimmune disease of horses. During recurring inflammatory attacks autoaggressive T-cells infiltrate the eye and subsequently cause neuro-retinal damage and, ultimately, blindness of the affected eye.

This study aimed at characterizing proteins of lymphocytes obtained from ERU-affected eyes, and thereby contributing to elucidation of ERU pathogenesis. Septin7, a protein which was previously shown to be down-regulated in peripheral blood-derived lymphocytes of ERU cases compared to control horses, was of special interest. Due to its important role in stabilizing cytoskeletal structures, it possibly is of crucial importance for ERU pathomechanisms.

To gain suitable tools for this attempt, seven monoclonal antibodies directed against equine septin7 were established and subsequently analyzed for their capability of detecting this important cytoskeletal protein in analytically relevant methods. For each of these methods, Western Blot, flow cytometry, immunocyto- and immunohistochemistry and immunoprecipitation, at least one highly appropriate antibody for septin7 detection in cells of horses could be identified.

After antibodies were established, expression analyses of septin7 in peripheral and intravitreal lymphocytes of ERU patients were performed. Interestingly, septin7 was 4.7 fold up-regulated in intravitreal lymphocytes compared to blood-derived lymphocytes. A subsequently applied transmigration assay with septin7-silenced lymphocytes versus lymphocytes with physiological septin7 expression revealed increased cell migration through RPE cells by 28% upon silencing and indicated functional relevance of septin7 for lymphocyte transmigration during ERU.

To further characterize its functions in horse lymphocytes, immunoprecipitation of septin7 was performed from these cells. Analyzing the immunoprecipitate by mass spectrometry, 47 interactors of septin7 were detected, which were not identified to be associated with septin7 in equine lymphocytes before. Among these, vimentin, another cytoskeletal protein, and lactotransferrin, a versatile modulator of immune responses, were of superior functional interest to us. Flow cytometric expression analyses were conducted for both proteins and revealed differential regulation between blood- and vitreous-derived lymphocytes. Vimentin was only expressed by 12% of intraocular cells, whereby its peripheral expression rate was 71% for ERU

lymphocytes. In contrast, LTF fluorescent intensity was significantly up-regulated by a factor of 8.8 in intraocular lymphocytes compared to peripheral cells. Both those changes arose preferentially in CD4<sup>+</sup> cells.

Additional to further characterization of septin7 in lymphocytes from horses suffering from ERU, we focused on identification of differentially regulated surface membrane proteins between peripheral and intraocular ERU lymphocytes. Surface biotinylation of these cells and subsequent analysis of cell surface membrane protein-enriched samples through a proteomic approach yielded a total of 146 differentially expressed proteins, of which none had ever been investigated for participation in ERU pathology before. Up-regulation in intraocular lymphocytes was confirmed by flow cytometry for two especially interesting proteins, CD150, a stimulator of TCR-mediated signaling, and CD166, which associates with T-cell activation and leukocyte migration. A transmigration assay of cells, in which CD166 signaling was blocked with monoclonal anti-CD166 antibody, showed potential functional relevance for this protein in ERU pathogenesis, as was shown likewise for septin7.

By experiments carried out in this study, a variety of interesting differentially regulated candidates were found in lymphocytes of ERU cases. Changed expression was verified for vimentin, LTF, CD155 and CD166. Their functional contribution to ERU pathogenesis remains largely undetermined and should be targeted in further studies. Furthermore, septin7 interacting protein cdc42 as well as differentially regulated cell surface proteins P2X purinoreceptor, SIGIRR and CD6 might be of particular functional relevance for ERU pathophysiology. These proteins' involvement in ERU should also be objected in future experiments to elucidate pathogenesis of this frequently occurring and severe disease in horses.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

- Abadier, M., Jahromi, N. H., Cardoso-Alves, L., Boscacci, R., Vestweber, D., Barnum, S., Deutsch, U., Engelhardt, B. and Lyck, R. (2014) Cell surface levels of endothelial ICAM-1 influence the transcellular or paracellular T-cell diapedesis across the blood-brain barrier. *Eur J Immunol*, doi: 10.1002/eji.201445125
- Abderrazak, A., Syrovets, T., Couchie, D., El Hadri, K., Friguet, B., Simmet, T. and Rouis, M. (2015) NLRP3 inflammasome: From a danger signal sensor to a regulatory node of oxidative stress and inflammatory diseases. *Redox Biol*, 4C, p. 296, doi: 10.1016/j.redox.2015.01.008
- Actor, J. K., Hwang, S. A. and Kruzel, M. L. (2009) Lactoferrin as a natural immune modulator. *Curr Pharm Des*, 15(17), p. 1956
- Agarwal, R. K. and Caspi, R. R. (2004) Rodent models of experimental autoimmune uveitis. *Methods Mol Med*, 102, p. 395, doi: 10.1385/1-59259-805-6:395
- Al-Abbasi, F. A. (2015) In vitro activation of dibromoacetonitrile to cyanide by myeloperoxidase. *Toxicol Ind Health*, doi: 10.1177/0748233714567184
- Annunziato, F., Cosmi, L. and Romagnani, S. (2010) Human and murine Th17. *Curr Opin HIV AIDS*, 5(2), p. 114, doi: 10.1097/COH.0b013e32833647c2
- Antonelli, A., Ferrari, S. M., Corrado, A., Di Domenicantonio, A. and Fallahi, P. (2015) Autoimmune thyroid disorders. *Autoimmun Rev*, 14(2), p. 174, doi: 10.1016/j.autrev.2014.10.016
- Arredondo Zamarripa, D., Diaz-Lezama, N., Melendez Garcia, R., Chavez Balderas, J., Adan, N., Ledesma-Colunga, M. G., Arnold, E., Clapp, C. and Thebault, S. (2014) Vasoinhibins regulate the inner and outer blood-retinal barrier and limit retinal oxidative stress. *Front Cell Neurosci*, 8, p. 333, doi: 10.3389/fncel.2014.00333
- Azizi-Semrad, U., Krenbek, D., Hofbauer, G., Karanikas, G., Maldonado-Gonzalez, E., Pietschmann, P. and Willheim, M. (2010) Cytokine profiling of human peripheral blood CD4+ T lymphocytes reveals a new Th-subpopulation (Th6) characterized by IL-6. *Eur Cytokine Netw*, 21(2), p. 105, doi: 10.1684/ecn.2010.0190
- Barkalow, K. L., Falet, H., Italiano, J. E., Jr., van Vugt, A., Carpenter, C. L., Schreiber, A. D. and Hartwig, J. H. (2003) Role for phosphoinositide 3-kinase in Fc gamma RIIA-induced platelet shape change. *Am J Physiol Cell Physiol*, 285(4), p. 797, doi: 10.1152/ajpcell.00165.2003
- Barreiro, O., de la Fuente, H., Mittelbrunn, M. and Sanchez-Madrid, F. (2007) Functional insights on the polarized redistribution of leukocyte integrins and their ligands during leukocyte migration and immune interactions. *Immunol Rev*, 218, p. 147, doi: 10.1111/j.1600-065X.2007.00529.x



- Bauer, K., Kratzer, M., Otte, M., de Quintana, K. L., Hagmann, J., Arnold, G. J., Eckerskorn, C., Lottspeich, F. and Siess, W. (2000) Human CLP36, a PDZ-domain and LIM-domain protein, binds to alpha-actinin-1 and associates with actin filaments and stress fibers in activated platelets and endothelial cells. *Blood*, 96(13), p. 4236
- Benhar, I., London, A. and Schwartz, M. (2012) The privileged immunity of immune privileged organs: the case of the eye. *Front Immunol*, 3, p. 296, doi: 10.3389/fimmu.2012.00296
- Bourreau, E., Prevot, G., Pradinaud, R. and Launois, P. (2001) Unresponsiveness of specific T cells to IL-12 is associated with active cutaneous leishmaniasis owing to *Leishmania guyanensis*. *Scand J Immunol*, 54(3), p. 335
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, p. 248
- Broermann, A., Winderlich, M., Block, H., Frye, M., Rossaint, J., Zarbock, A., Cagna, G., Linnepe, R., Schulte, D., Nottebaum, A. F. and Vestweber, D. (2011) Dissociation of VE-PTP from VE-cadherin is required for leukocyte extravasation and for VEGF-induced vascular permeability in vivo. *J Exp Med*, 208(12), p. 2393, doi: 10.1084/jem.20110525
- Broussard, J. A., Getsios, S. and Green, K. J. (2015) Desmosome regulation and signaling in disease. *Cell Tissue Res*, doi: 10.1007/s00441-015-2136-5
- Brown, M. J., Hallam, J. A., Colucci-Guyon, E. and Shaw, S. (2001) Rigidity of circulating lymphocytes is primarily conferred by vimentin intermediate filaments. *J Immunol*, 166(11), p. 6640
- Buonomo, R., Giacco, F., Vasaturo, A., Caserta, S., Guido, S., Pagliara, V., Garbi, C., Mansueto, G., Cassese, A., Perruolo, G., Oriente, F., Miele, C., Beguinot, F. and Formisano, P. (2012) PED/PEA-15 controls fibroblast motility and wound closure by ERK1/2-dependent mechanisms. *J Cell Physiol*, 227(5), p. 2106, doi: 10.1002/jcp.22944
- Calder, V. L., Zhao, Z. S., Wang, Y., Barton, K. and Lightman, S. L. (1993) Effects of CD8 depletion on retinal soluble antigen induced experimental autoimmune uveoretinitis. *Immunology*, 79(2), p. 255
- Calderwood, D. A. (2004) Integrin activation. *J Cell Sci*, 117(Pt 5), p. 657, doi: 10.1242/jcs.01014
- Calderwood, D. A. and Ginsberg, M. H. (2003) Talin forges the links between integrins and actin. *Nat Cell Biol*, 5(8), p. 694, doi: 10.1038/ncb0803-694
- Calpe, S., Wang, N., Romero, X., Berger, S. B., Lanyi, A., Engel, P. and Terhorst, C. (2008) The SLAM and SAP gene families control innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol*, 97, p. 177, doi: 10.1016/S0065-2776(08)00004-7

- Cannons, J. L., Yu, L. J., Hill, B., Mijares, L. A., Dombroski, D., Nichols, K. E., Antonellis, A., Koretzky, G. A., Gardner, K. and Schwartzberg, P. L. (2004) SAP regulates T(H)2 differentiation and PKC-theta-mediated activation of NF-kappaB1. *Immunity*, 21(5), p. 693, doi: 10.1016/j.immuni.2004.09.012
- Carman, C. V., Sage, P. T., Sciuto, T. E., de la Fuente, M. A., Geha, R. S., Ochs, H. D., Dvorak, H. F., Dvorak, A. M. and Springer, T. A. (2007) Transcellular diapedesis is initiated by invasive podosomes. *Immunity*, 26(6), p. 784, doi: 10.1016/j.immuni.2007.04.015
- Carrion, M., Juarranz, Y., Martinez, C., Gonzalez-Alvaro, I., Pablos, J. L., Gutierrez-Canas, I. and Gomariz, R. P. (2013) IL-22/IL-22R1 axis and S100A8/A9 alarmins in human osteoarthritic and rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Rheumatology (Oxford)*, 52(12), p. 2177, doi: 10.1093/rheumatology/ket315
- Caruso, R., Costanzo, A. and Monteleone, G. (2009) Pathogenic role of interleukin-21 in psoriasis. *Cell Cycle*, 8(22), p. 3629
- Caso, F., Rigante, D., Vitale, A., Costa, L., Bascherini, V., Latronico, E., Franceschini, R. and Cantarini, L. (2014) Long-lasting uveitis remission and hearing loss recovery after rituximab in Vogt-Koyanagi-Harada disease. *Clin Rheumatol*, doi: 10.1007/s10067-014-2781-1
- Caspi, R. R. (2003) Experimental autoimmune uveoretinitis in the rat and mouse. *Curr Protoc Immunol*, doi: 10.1002/0471142735.im1506s53
- Caspi, R. R. (2010) A look at autoimmunity and inflammation in the eye. *J Clin Invest*, 120(9), p. 3073, doi: 10.1172/JCI42440
- Caspi, R. R. (2014) Understanding autoimmunity in the eye: from animal models to novel therapies. *Discov Med*, 17(93), p. 155
- Caspi, R. R., Chan, C. C., Fujino, Y., Najafian, F., Grover, S., Hansen, C. T. and Wilder, R. L. (1993) Recruitment of antigen-nonspecific cells plays a pivotal role in the pathogenesis of a T cell-mediated organ-specific autoimmune disease, experimental autoimmune uveoretinitis. *J Neuroimmunol*, 47(2), p. 177
- Caspi, R. R., Roberge, F. G., McAllister, C. G., el-Saied, M., Kuwabara, T., Gery, I., Hanna, E. and Nussenblatt, R. B. (1986) T cell lines mediating experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) in the rat. *J Immunol*, 136(3), p. 928
- Caspi, R. R., Silver, P. B., Luger, D., Tang, J., Cortes, L. M., Pennesi, G., Mattapallil, M. J. and Chan, C. C. (2008) Mouse models of experimental autoimmune uveitis. *Ophthalmic Res*, 40(3-4), p. 169, doi: 10.1159/000119871
- Cayrol, R., Wosik, K., Berard, J. L., Dodelet-Devillers, A., Ifergan, I., Kebir, H., Haqqani, A. S., Kreymborg, K., Krug, S., Moumdjian, R., Bouthillier, A., Becher, B., Arbour, N., David, S., Stanimirovic, D. and Prat, A. (2008) Activated leukocyte cell adhesion molecule promotes leukocyte trafficking into the central nervous system. *Nat Immunol*, 9(2), p. 137, doi: 10.1038/ni1551

- Chang, H. C., Sehra, S., Goswami, R., Yao, W., Yu, Q., Stritesky, G. L., Jabeen, R., McKinley, C., Ahyi, A. N., Han, L., Nguyen, E. T., Robertson, M. J., Perumal, N. B., Tepper, R. S., Nutt, S. L. and Kaplan, M. H. (2010) The transcription factor PU.1 is required for the development of IL-9-producing T cells and allergic inflammation. *Nat Immunol*, 11(6), p. 527, doi: 10.1038/ni.1867
- Chang, J. H. and Wakefield, D. (2002) Uveitis: a global perspective. *Ocul Immunol Inflamm*, 10(4), p. 263
- Chatterjee, M., Rauen, T., Kis-Toth, K., Kyttaris, V. C., Hedrich, C. M., Terhorst, C. and Tsokos, G. C. (2012) Increased expression of SLAM receptors SLAMF3 and SLAMF6 in systemic lupus erythematosus T lymphocytes promotes Th17 differentiation. *J Immunol*, 188(3), p. 1206, doi: 10.4049/jimmunol.1102773
- Chen, R., Latour, S., Shi, X. and Veillette, A. (2006) Association between SAP and FynT: Inducible SH3 domain-mediated interaction controlled by engagement of the SLAM receptor. *Mol Cell Biol*, 26(15), p. 5559, doi: 10.1128/MCB.00357-06
- Chen, S., Zhou, S., Zang, K., Kong, F., Liang, D. and Yan, H. (2014) CD73 expression in RPE cells is associated with the suppression of conventional CD4 cell proliferation. *Exp Eye Res*, 127, p. 26, doi: 10.1016/j.exer.2014.05.008
- Chichger, H., Duong, H., Braza, J. and Harrington, E. O. (2014) p18, a novel adaptor protein, regulates pulmonary endothelial barrier function via enhanced endocytic recycling of VE-cadherin. *FASEB J*, doi: 10.1096/fj.14-257212
- Conrad, D. M., Furlong, S. J., Doucette, C. D., Boudreau, R. T. and Hoskin, D. W. (2009) Role of mitogen-activated protein kinases in Thy-1-induced T-lymphocyte activation. *Cell Signal*, 21(8), p. 1298, doi: 10.1016/j.cellsig.2009.03.014
- Cosmi, L., Liotta, F., Maggi, E., Romagnani, S. and Annunziato, F. (2014) Th17 and non-classic Th1 cells in chronic inflammatory disorders: two sides of the same coin. *Int Arch Allergy Immunol*, 164(3), p. 171, doi: 10.1159/000363502
- Costello, D. A., Carney, D. G. and Lynch, M. A. (2015) alpha-TLR2 antibody attenuates the Abeta-mediated inflammatory response in microglia through enhanced expression of SIGIRR. *Brain Behav Immun*, doi: 10.1016/j.bbi.2015.01.005
- Crane, I. J. and Liversidge, J. (2008) Mechanisms of leukocyte migration across the blood-retina barrier. *Semin Immunopathol*, 30(2), p. 165, doi: 10.1007/s00281-008-0106-7
- Critchley, D. R. (2000) Focal adhesions - the cytoskeletal connection. *Curr Opin Cell Biol*, 12(1), p. 133
- Critchley, D. R. (2009) Biochemical and structural properties of the integrin-associated cytoskeletal protein talin. *Annu Rev Biophys*, 38, p. 235, doi: 10.1146/annurev.biophys.050708.133744
- Cua, D. J., Sherlock, J., Chen, Y., Murphy, C. A., Joyce, B., Seymour, B., Lucian, L., To, W., Kwan, S., Churakova, T., Zurawski, S., Wiekowski, M., Lira, S. A., Gorman, D., Kastelein, R. A. and Sedgwick, J. D. (2003) Interleukin-23 rather than interleukin-12

- is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature*, 421(6924), p. 744, doi: 10.1038/nature01355
- Curling, A. (2011) Equine recurrent uveitis: treatment. *Compend Contin Educ Vet*, 33(6)
- Daneman, R. (2012) The blood-brain barrier in health and disease. *Ann Neurol*, 72(5), p. 648, doi: 10.1002/ana.23648
- Dave, J. M. and Bayless, K. J. (2014) Vimentin as an integral regulator of cell adhesion and endothelial sprouting. *Microcirculation*, 21(4), p. 333, doi: 10.1111/micc.12111
- David, M. D., Petit, D. and Bertoglio, J. (2014) The RhoGAP ARHGAP19 controls cytokinesis and chromosome segregation in T lymphocytes. *J Cell Sci*, 127(Pt 2), p. 400, doi: 10.1242/jcs.135079
- Davidson, D., Shi, X., Zhang, S., Wang, H., Nemer, M., Ono, N., Ohno, S., Yanagi, Y. and Veillette, A. (2004) Genetic evidence linking SAP, the X-linked lymphoproliferative gene product, to Src-related kinase FynT in T(H)2 cytokine regulation. *Immunity*, 21(5), p. 707, doi: 10.1016/j.immuni.2004.10.005
- de la Rosa, G., Yang, D., Tewary, P., Varadhachary, A. and Oppenheim, J. J. (2008) Lactoferrin acts as an alarmin to promote the recruitment and activation of APCs and antigen-specific immune responses. *J Immunol*, 180(10), p. 6868
- Deaglio, S., Dwyer, K. M., Gao, W., Friedman, D., Usheva, A., Erat, A., Chen, J. F., Enjyoji, K., Linden, J., Oukka, M., Kuchroo, V. K., Strom, T. B. and Robson, S. C. (2007) Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med*, 204(6), p. 1257, doi: 10.1084/jem.20062512
- Deeg, C. A., Amann, B., Raith, A. J. and Kaspers, B. (2006a) Inter- and intramolecular epitope spreading in equine recurrent uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47(2), p. 652, doi: 10.1167/iovs.05-0789
- Deeg, C. A., Eberhardt, C., Hofmaier, F., Amann, B. and Hauck, S. M. (2011) Osteopontin and fibronectin levels are decreased in vitreous of autoimmune uveitis and retinal expression of both proteins indicates ECM re-modeling. *PLoS One*, 6(12), p. 27674, doi: 10.1371/journal.pone.0027674
- Deeg, C. A., Ehrenhofer, M., Thureau, S. R., Reese, S., Wildner, G. and Kaspers, B. (2002a) Immunopathology of recurrent uveitis in spontaneously diseased horses. *Exp Eye Res*, 75(2), p. 127
- Deeg, C. A., Hauck, S. M., Amann, B., Kremmer, E., Stangassinger, M. and Ueffing, M. (2007a) Major retinal autoantigens remain stably expressed during all stages of spontaneous uveitis. *Mol Immunol*, 44(13), p. 3291, doi: 10.1016/j.molimm.2007.02.027
- Deeg, C. A., Kaspers, B., Gerhards, H., Thureau, S. R., Wollanke, B. and Wildner, G. (2001) Immune responses to retinal autoantigens and peptides in equine recurrent uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 42(2), p. 393

- Deeg, C. A., Pompetzki, D., Raith, A. J., Hauck, S. M., Amann, B., Suppmann, S., Goebel, T. W., Olazabal, U., Gerhards, H., Reese, S., Stangassinger, M., Kaspers, B. and Ueffing, M. (2006b) Identification and functional validation of novel autoantigens in equine uveitis. *Mol Cell Proteomics*, 5(8), p. 1462, doi: 10.1074/mcp.M500352-MCP200
- Deeg, C. A., Raith, A. J., Amann, B., Crabb, J. W., Thurau, S. R., Hauck, S. M., Ueffing, M., Wildner, G. and Stangassinger, M. (2007b) CRALBP is a highly prevalent autoantigen for human autoimmune uveitis. *Clin Dev Immunol*, 2007, p. 39245, doi: 10.1155/2007/39245
- Deeg, C. A., Reese, S., Gerhards, H., Wildner, G. and Kaspers, B. (2004) The uveitogenic potential of retinal S-antigen in horses. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45(7), p. 2286
- Deeg, C. A., Thurau, S. R., Gerhards, H., Ehrenhofer, M., Wildner, G. and Kaspers, B. (2002b) Uveitis in horses induced by interphotoreceptor retinoid-binding protein is similar to the spontaneous disease. *Eur J Immunol*, 32(9), p. 2598, doi: 10.1002/1521-4141(200209)32:9<2598::AID-IMMU2598>3.0.CO;2-#
- Degroote, R. L., Hauck, S. M., Amann, B., Hirmer, S., Ueffing, M. and Deeg, C. A. (2014) Unraveling the equine lymphocyte proteome: differential septin 7 expression associates with immune cells in equine recurrent uveitis. *PLoS One*, 9(3), p. 91684, doi: 10.1371/journal.pone.0091684
- Degroote, R. L., Hauck, S. M., Kremmer, E., Amann, B., Ueffing, M. and Deeg, C. A. (2012) Altered expression of talin 1 in peripheral immune cells points to a significant role of the innate immune system in spontaneous autoimmune uveitis. *J Proteomics*, 75(14), p. 4536, doi: 10.1016/j.jprot.2012.01.023
- Degroote, R. L., Hauck, S. M., Treutlein, G., Amann, B., Frohlich, K. J., Kremmer, E., Merl, J., Stangassinger, M., Ueffing, M. and Deeg, C. A. (2013) Expression changes and novel interaction partners of talin 1 in effector cells of autoimmune uveitis. *J Proteome Res*, 12(12), p. 5812, doi: 10.1021/pr400837f
- Deli, M. A., Descamps, L., Dehouck, M. P., Cecchelli, R., Joo, F., Abraham, C. S. and Torpier, G. (1995) Exposure of tumor necrosis factor-alpha to luminal membrane of bovine brain capillary endothelial cells cocultured with astrocytes induces a delayed increase of permeability and cytoplasmic stress fiber formation of actin. *J Neurosci Res*, 41(6), p. 717, doi: 10.1002/jnr.490410602
- Detrick, B. and Hooks, J. J. (2010) Immune regulation in the retina. *Immunol Res*, 47(1-3), p. 153, doi: 10.1007/s12026-009-8146-1
- Devine, L., Lightman, S. L. and Greenwood, J. (1996) Role of LFA-1, ICAM-1, VLA-4 and VCAM-1 in lymphocyte migration across retinal pigment epithelial monolayers in vitro. *Immunology*, 88(3), p. 456
- Dhennin-Duthille, I., Masson, M., Damiens, E., Fillebeen, C., Spik, G. and Mazurier, J. (2000) Lactoferrin upregulates the expression of CD4 antigen through the stimulation of the mitogen-activated protein kinase in the human lymphoblastic T Jurkat cell line. *J Cell Biochem*, 79(4), p. 583

- Diedrichs-Möhring, M., Leban, J., Strobl, S., Obermayr, F. and Wildner, G. (2014) A new small molecule for treating inflammation and chorioretinal neovascularization in relapsing-remitting and chronic experimental autoimmune uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, doi: 10.1167/iovs.14-15518
- Dilek, N., Poirier, N., Hulin, P., Coulon, F., Mary, C., Ville, S., Vie, H., Clemenceau, B., Blanco, G. and Vanhove, B. (2013) Targeting CD28, CTLA-4 and PD-L1 costimulation differentially controls immune synapses and function of human regulatory and conventional T-cells. *PLoS One*, 8(12), p. 83139, doi: 10.1371/journal.pone.0083139
- Doherty, M. K. and Whitfield, P. D. (2011) Proteomics moves from expression to turnover: update and future perspective. *Expert Rev Proteomics*, 8(3), p. 325, doi: 10.1586/epr.11.19
- Dolat, L., Hunyara, J. L., Bowen, J. R., Karasmanis, E. P., Elgawly, M., Galkin, V. E. and Spiliotis, E. T. (2014) Septins promote stress fiber-mediated maturation of focal adhesions and renal epithelial motility. *J Cell Biol*, 207(2), p. 225, doi: 10.1083/jcb.201405050
- Dominguez, G. A. and Hammer, D. A. (2014) Effect of adhesion and chemokine presentation on T-lymphocyte haptokinesis. *Integr Biol (Camb)*, 6(9), p. 862, doi: 10.1039/c4ib00094c
- Doucette, C. D., Greenshields, A. L., Liwski, R. S. and Hoskin, D. W. (2015) Piperine blocks interleukin-2-driven cell cycle progression in CTLL-2T lymphocytes by inhibiting multiple signal transduction pathways. *Toxicol Lett*, doi: 10.1016/j.toxlet.2015.01.020
- Duran-Aniotz, C., Segal, G., Salazar, L., Pereda, C., Falcon, C., Tempio, F., Aguilera, R., Gonzalez, R., Perez, C., Tittarelli, A., Catalan, D., Nervi, B., Larrondo, M., Salazar-Onfray, F. and Lopez, M. N. (2013) The immunological response and post-treatment survival of DC-vaccinated melanoma patients are associated with increased Th1/Th17 and reduced Th3 cytokine responses. *Cancer Immunol Immunother*, 62(4), p. 761, doi: 10.1007/s00262-012-1377-3
- Economopoulou, M., Hammer, J., Wang, F., Fariss, R., Maminishkis, A. and Miller, S. S. (2009) Expression, localization, and function of junctional adhesion molecule-C (JAM-C) in human retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 50(3), p. 1454, doi: 10.1167/iovs.08-2129
- Ehrlich, P. (1885) *Das Sauerstoff-Bedürfniss des Organismus: Eine farbenanalytische Studie. Habilitationsschrift*, Berlin.
- Ekinci, N. S., Alpsoy, E., Karakas, A. A., Yilmaz, S. B. and Yegin, O. (2010) IL-17A has an important role in the acute attacks of Behcet's disease. *J Invest Dermatol*, 130(8), p. 2136, doi: 10.1038/jid.2010.114
- Elyaman, W., Bradshaw, E. M., Uyttenhove, C., Dardalhon, V., Awasthi, A., Imitola, J., Bettelli, E., Oukka, M., van Snick, J., Renauld, J. C., Kuchroo, V. K. and Khoury, S. J. (2009) IL-9 induces differentiation of TH17 cells and enhances function of FoxP3+

- natural regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(31), p. 12885, doi: 10.1073/pnas.0812530106
- Engelhardt, B. and Ransohoff, R. M. (2012) Capture, crawl, cross: the T cell code to breach the blood-brain barriers. *Trends Immunol*, 33(12), p. 579, doi: 10.1016/j.it.2012.07.004
- Enzmann, V., Hollborn, M., Wiedemann, P. and Kohen, L. (2001) Molecular and cellular evidence for T-cell stimulation by allogeneic retinal pigment epithelium cells in vitro. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 239(6), p. 445
- Eriksen, K. W., Woetmann, A., Skov, L., Krejsgaard, T., Bovin, L. F., Hansen, M. L., Gronbaek, K., Billestrup, N., Nissen, M. H., Geisler, C., Wasik, M. A. and Odum, N. (2010) Deficient SOCS3 and SHP-1 expression in psoriatic T cells. *J Invest Dermatol*, 130(6), p. 1590, doi: 10.1038/jid.2010.6
- Eriksson, E. E., Xie, X., Werr, J., Thoren, P. and Lindbom, L. (2001) Importance of primary capture and L-selectin-dependent secondary capture in leukocyte accumulation in inflammation and atherosclerosis in vivo. *J Exp Med*, 194(2), p. 205
- Espino, E., Koskeniemi, K., Mato-Rodriguez, L., Nyman, T. A., Reunanen, J., Koponen, J., Ohman, T., Siljamaki, P., Alatossava, T., Varmanen, P. and Savijoki, K. (2014) Uncovering Surface-Exposed Antigens of *Lactobacillus rhamnosus* by Cell Shaving Proteomics and Two-Dimensional Immunoblotting. *J Proteome Res*, doi: 10.1021/pr501041a
- Feldmann, M. and Steinman, L. (2005) Design of effective immunotherapy for human autoimmunity. *Nature*, 435(7042), p. 612, doi: 10.1038/nature03727
- Ferrante, P., Fusi, M. L., Saresella, M., Caputo, D., Biasin, M., Trabattoni, D., Salvaggio, A., Clerici, E., de Vries, J. E., Aversa, G., Cazzullo, C. L. and Clerici, M. (1998) Cytokine production and surface marker expression in acute and stable multiple sclerosis: altered IL-12 production and augmented signaling lymphocytic activation molecule (SLAM)-expressing lymphocytes in acute multiple sclerosis. *J Immunol*, 160(3), p. 1514
- Fievet, B. T., Gautreau, A., Roy, C., Del Maestro, L., Mangeat, P., Louvard, D. and Arpin, M. (2004) Phosphoinositide binding and phosphorylation act sequentially in the activation mechanism of ezrin. *J Cell Biol*, 164(5), p. 653, doi: 10.1083/jcb.200307032
- Fiorini, E., Marchisio, P. C., Scupoli, M. T., Poffe, O., Tagliabue, E., Brentegani, M., Colombatti, M., Santini, F., Tridente, G. and Ramarli, D. (2000) Adhesion of immature and mature T cells induces in human thymic epithelial cells (TEC) activation of IL-6 gene transcription factors (NF-kappaB and NF-IL6) and IL-6 gene expression: role of alpha3beta1 and alpha6beta4 integrins. *Dev Immunol*, 7(2-4), p. 195
- Fischer, R., Debbabi, H., Dubarry, M., Boyaka, P. and Tome, D. (2006) Regulation of physiological and pathological Th1 and Th2 responses by lactoferrin. *Biochem Cell Biol*, 84(3), p. 303, doi: 10.1139/o06-058

- Fritz, K. L., Kaese, H. J., Valberg, S. J., Hendrickson, J. A., Rendahl, A. K., Bellone, R. R., Dynes, K. M., Wagner, M. L., Lucio, M. A., Cuomo, F. M., Brinkmeyer-Langford, C. L., Skow, L. C., Mickelson, J. R., Rutherford, M. S. and McCue, M. E. (2014) Genetic risk factors for insidious equine recurrent uveitis in Appaloosa horses. *Anim Genet*, 45(3), p. 392, doi: 10.1111/age.12129
- Fröhlich, K. (2015) Untersuchungen zur Immunpathogenese der Bovinen Neonatalen Panzytopenie. *Dissertationsschrift, Ludwig-Maximilians-Universität München*.
- Fruhauf, B., Ohnesorge, B., Deegen, E. and Boeve, M. (1998) Surgical management of equine recurrent uveitis with single port pars plana vitrectomy. *Vet Ophthalmol*, 1(2-3), p. 137
- Gatselis, N. K., Zachou, K., Koukoulis, G. K. and Dalekos, G. N. (2015) Autoimmune hepatitis, one disease with many faces: Etiopathogenetic, clinico-laboratory and histological characteristics. *World J Gastroenterol*, 21(1), p. 60, doi: 10.3748/wjg.v21.i1.60
- Geginat, J., Paroni, M., Maglie, S., Alfen, J. S., Kastirr, I., Gruarin, P., De Simone, M., Pagani, M. and Abrignani, S. (2014) Plasticity of human CD4 T cell subsets. *Front Immunol*, 5, p. 630, doi: 10.3389/fimmu.2014.00630
- Gerli, R., Paolucci, C., Gresele, P., Bistoni, O., Fiorucci, S., Muscat, C., Belia, S., Bertotto, A. and Costantini, V. (1998) Salicylates inhibit adhesion and transmigration of T lymphocytes by preventing integrin activation induced by contact with endothelial cells. *Blood*, 92(7), p. 2389
- Gilger, B. C., Malok, E., Cutter, K. V., Stewart, T., Horohov, D. W. and Allen, J. B. (1999) Characterization of T-lymphocytes in the anterior uvea of eyes with chronic equine recurrent uveitis. *Vet Immunol Immunopathol*, 71(1), p. 17
- Gilger, B. C. and Michau, T. M. (2004) Equine recurrent uveitis: new methods of management. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 20(2), p. 417, doi: 10.1016/j.cveq.2004.04.010
- Gilger, B. C., Wilkie, D. A., Clode, A. B., McMullen, R. J., Jr., Utter, M. E., Komaromy, A. M., Brooks, D. E. and Salmon, J. H. (2010) Long-term outcome after implantation of a suprachoroidal cyclosporine drug delivery device in horses with recurrent uveitis. *Vet Ophthalmol*, 13(5), p. 294, doi: 10.1111/j.1463-5224.2010.00807.x
- Goh, W. W., Lee, Y. H., Chung, M. and Wong, L. (2012) How advancement in biological network analysis methods empowers proteomics. *Proteomics*, 12(4-5), p. 550, doi: 10.1002/pmic.201100321
- Goldmann, E. E. (1913) Vitalfärbung am Zentralnervensystem. *Abh. K. Preuss. Akad. Wiss. Phys. Med. I*, p. 1
- Green, C. E., Schaff, U. Y., Sarantos, M. R., Lum, A. F., Staunton, D. E. and Simon, S. I. (2006) Dynamic shifts in LFA-1 affinity regulate neutrophil rolling, arrest, and transmigration on inflamed endothelium. *Blood*, 107(5), p. 2101, doi: 10.1182/blood-2005-06-2303



- Gregerson, D. S., Heuss, N. D., Lew, K. L., McPherson, S. W. and Ferrington, D. A. (2007) Interaction of retinal pigmented epithelial cells and CD4 T cells leads to T-cell anergy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 48(10), p. 4654, doi: 10.1167/iovs.07-0286
- Gunter, K. C., Malek, T. R. and Shevach, E. M. (1984) T cell-activating properties of an anti-Thy-1 monoclonal antibody. Possible analogy to OKT3/Leu-4. *J Exp Med*, 159(3), p. 716
- Haanstra, K. G., Dijkman, K., Bashir, N., Bauer, J., Mary, C., Poirier, N., Baker, P., Scobie, L., t Hart, B. A. and Vanhove, B. (2015) Selective Blockade of CD28-Mediated T Cell Costimulation Protects Rhesus Monkeys against Acute Fatal Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Immunol*, 194(4), p. 1454, doi: 10.4049/jimmunol.1402563
- Hauck, S. M., Dietter, J., Kramer, R. L., Hofmaier, F., Zipplies, J. K., Amann, B., Feuchtinger, A., Deeg, C. A. and Ueffing, M. (2010) Deciphering membrane-associated molecular processes in target tissue of autoimmune uveitis by label-free quantitative mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*, 9(10), p. 2292, doi: 10.1074/mcp.M110.001073
- Hauck, S. M., Hofmaier, F., Dietter, J., Swadzba, M. E., Blindert, M., Amann, B., Behler, J., Kremmer, E., Ueffing, M. and Deeg, C. A. (2012) Label-free LC-MSMS analysis of vitreous from autoimmune uveitis reveals a significant decrease in secreted Wnt signalling inhibitors DKK3 and SFRP2. *J Proteomics*, 75(14), p. 4545, doi: 10.1016/j.jpro.2012.04.052
- Hepper, I., Schymeinsky, J., Weckbach, L. T., Jakob, S. M., Frommhold, D., Sixt, M., Laschinger, M., Sperandio, M. and Walzog, B. (2012) The mammalian actin-binding protein 1 is critical for spreading and intraluminal crawling of neutrophils under flow conditions. *J Immunol*, 188(9), p. 4590, doi: 10.4049/jimmunol.1100878
- Hines, M. T. (1984) Immunologically mediated ocular disease in the horse. *Vet Clin North Am Large Anim Pract*, 6(3), p. 501
- Hofmaier, F., Hauck, S. M., Amann, B., Degroote, R. L. and Deeg, C. A. (2011) Changes in matrix metalloproteinase network in a spontaneous autoimmune uveitis model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 52(5), p. 2314, doi: 10.1167/iovs.10-6475
- Horai, R., Silver, P. B., Chen, J., Agarwal, R. K., Chong, W. P., Jittayasothorn, Y., Mattapallil, M. J., Nguyen, S., Natarajan, K., Villasamil, R., Wang, P., Karabekian, Z., Lytton, S. D., Chan, C. C. and Caspi, R. R. (2013) Breakdown of immune privilege and spontaneous autoimmunity in mice expressing a transgenic T cell receptor specific for a retinal autoantigen. *J Autoimmun*, 44, p. 21, doi: 10.1016/j.jaut.2013.06.003
- Hsu, L. C.,ENZLER, T., Seita, J., Timmer, A. M., Lee, C. Y., Lai, T. Y., Yu, G. Y., Lai, L. C., Temkin, V., Sinzig, U., Aung, T., Nizet, V., Weissman, I. L. and Karin, M. (2011) IL-1beta-driven neutrophilia preserves antibacterial defense in the absence of the kinase IKKbeta. *Nat Immunol*, 12(2), p. 144, doi: 10.1038/ni.1976

- Hwang, I. Y., Park, C., Harrison, K., Boularan, C., Gales, C. and Kehrl, J. H. (2015) An Essential Role for RGS Protein/Galphai2 Interactions in B Lymphocyte-Directed Cell Migration and Trafficking. *J Immunol*, doi: 10.4049/jimmunol.1401952
- Hwang, S. A., Kruzel, M. L. and Actor, J. K. (2014) Immunomodulatory effects of recombinant lactoferrin during MRSA infection. *Int Immunopharmacol*, 20(1), p. 157, doi: 10.1016/j.intimp.2014.02.029
- Jager, A., Dardalhon, V., Sobel, R. A., Bettelli, E. and Kuchroo, V. K. (2009) Th1, Th17, and Th9 effector cells induce experimental autoimmune encephalomyelitis with different pathological phenotypes. *J Immunol*, 183(11), p. 7169, doi: 10.4049/jimmunol.0901906
- Jenner, R. G., Townsend, M. J., Jackson, I., Sun, K., Bouwman, R. D., Young, R. A., Glimcher, L. H. and Lord, G. M. (2009) The transcription factors T-bet and GATA-3 control alternative pathways of T-cell differentiation through a shared set of target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(42), p. 17876, doi: 10.1073/pnas.0909357106
- Jeong, H. J., Ohmuro-Matsuyama, Y., Ohashi, H., Ohsawa, F., Tatsu, Y., Inagaki, M. and Ueda, H. (2013) Detection of vimentin serine phosphorylation by multicolor Quenchbodies. *Biosens Bioelectron*, 40(1), p. 17, doi: 10.1016/j.bios.2012.06.030
- Jevnikar, Z., Obermajer, N., Doljak, B., Turk, S., Gobec, S., Svajger, U., Hailfinger, S., Thome, M. and Kos, J. (2011) Cathepsin X cleavage of the beta2 integrin regulates talin-binding and LFA-1 affinity in T cells. *J Leukoc Biol*, 90(1), p. 99, doi: 10.1189/jlb.1110622
- Jia, Z. F., Huang, Q., Kang, C. S., Yang, W. D., Wang, G. X., Yu, S. Z., Jiang, H. and Pu, P. Y. (2010) Overexpression of septin 7 suppresses glioma cell growth. *J Neurooncol*, 98(3), p. 329, doi: 10.1007/s11060-009-0092-1
- Jin, S., Park, C. O., Shin, J. U., Noh, J. Y., Lee, Y. S., Lee, N. R., Kim, H. R., Noh, S., Lee, Y., Lee, J. H. and Lee, K. H. (2014) DAMP molecules S100A9 and S100A8 activated by IL-17A and house-dust mites are increased in atopic dermatitis. *Exp Dermatol*, 23(12), p. 938, doi: 10.1111/exd.12563
- Joberty, G., Perlungher, R. R., Sheffield, P. J., Kinoshita, M., Noda, M., Haystead, T. and Macara, I. G. (2001) Borg proteins control septin organization and are negatively regulated by Cdc42. *Nat Cell Biol*, 3(10), p. 861, doi: 10.1038/ncb1001-861
- Kelley, J. B., Dixit, G., Sheetz, J. B., Venkatapurapu, S. P., Elston, T. C. and Dohlman, H. G. (2015) RGS Proteins and Septins Cooperate to Promote Chemotropism by Regulating Polar Cap Mobility. *Curr Biol*, doi: 10.1016/j.cub.2014.11.047
- Kerr, E. C., Raveney, B. J., Copland, D. A., Dick, A. D. and Nicholson, L. B. (2008) Analysis of retinal cellular infiltrate in experimental autoimmune uveoretinitis reveals multiple regulatory cell populations. *J Autoimmun*, 31(4), p. 354, doi: 10.1016/j.jaut.2008.08.006
- Kerur, N., Hirano, Y., Tarallo, V., Fowler, B. J., Bastos-Carvalho, A., Yasuma, T., Yasuma, R., Kim, Y., Hinton, D. R., Kirschning, C. J., Gelfand, B. D. and Ambati, J. (2013)

- TLR-independent and P2X7-dependent signaling mediate Alu RNA-induced NLRP3 inflammasome activation in geographic atrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 54(12), p. 7395, doi: 10.1167/iovs.13-12500
- Keymeulen, B., Vandemeulebroucke, E., Ziegler, A. G., Mathieu, C., Kaufman, L., Hale, G., Gorus, F., Goldman, M., Walter, M., Candon, S., Schandene, L., Crenier, L., De Block, C., Seigneurin, J. M., De Pauw, P., Pierard, D., Weets, I., Rebello, P., Bird, P., Berrie, E., Frewin, M., Waldmann, H., Bach, J. F., Pipeleers, D. and Chatenoud, L. (2005) Insulin needs after CD3-antibody therapy in new-onset type 1 diabetes. *N Engl J Med*, 352(25), p. 2598, doi: 10.1056/NEJMoa043980
- Kim, J., Park, J. A., Lee, E. Y., Lee, Y. J., Song, Y. W. and Lee, E. B. (2010) Imbalance of Th17 to Th1 cells in Behcet's disease. *Clin Exp Rheumatol*, 28(4 Suppl 60), p. Suppl. 16
- Kinloch, A. J., Chang, A., Ko, K., Henry Dunand, C. J., Henderson, S., Maienschein-Cline, M., Kaverina, N., Rovin, B. H., Salgado Ferrer, M., Wolfgeher, D., Liarski, V., Haddon, D. J., Utz, P. J., Wilson, P. C. and Clark, M. R. (2014) Vimentin is a dominant target of in situ humoral immunity in human lupus tubulointerstitial nephritis. *Arthritis Rheumatol*, 66(12), p. 3359, doi: 10.1002/art.38888
- Kolm, G., Klein, D., Knapp, E., Watanabe, K. and Walter, I. (2006) Lactoferrin expression in the horse endometrium: relevance in persisting mating-induced endometritis. *Vet Immunol Immunopathol*, 114(1-2), p. 159, doi: 10.1016/j.vetimm.2006.08.005
- Konrad, F. M., Witte, E., Vollmer, I., Stark, S. and Reutershan, J. (2012) Adenosine receptor A2b on hematopoietic cells mediates LPS-induced migration of PMNs into the lung interstitium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 303(5), p. 425, doi: 10.1152/ajplung.00387.2011
- Koyama, M., Kuns, R. D., Olver, S. D., Lineburg, K. E., Lor, M., Teal, B. E., Raffelt, N. C., Leveque, L., Chan, C. J., Robb, R. J., Markey, K. A., Alexander, K. A., Varelias, A., Clouston, A. D., Smyth, M. J., MacDonald, K. P. and Hill, G. R. (2013) Promoting regulation via the inhibition of DNAM-1 after transplantation. *Blood*, 121(17), p. 3511, doi: 10.1182/blood-2012-07-444026
- Krause, M. and Gautreau, A. (2014) Steering cell migration: lamellipodium dynamics and the regulation of directional persistence. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(9), p. 577, doi: 10.1038/nrm3861
- Kremer, B. E., Adang, L. A. and Macara, I. G. (2007) Septins regulate actin organization and cell-cycle arrest through nuclear accumulation of NCK mediated by SOCS7. *Cell*, 130(5), p. 837, doi: 10.1016/j.cell.2007.06.053
- Kremer, B. E., Haystead, T. and Macara, I. G. (2005) Mammalian septins regulate microtubule stability through interaction with the microtubule-binding protein MAP4. *Mol Biol Cell*, 16(10), p. 4648, doi: 10.1091/mbc.E05-03-0267
- Kremer, L. and Marquez, G. (2004) Generation of monoclonal antibodies against chemokine receptors. *Methods Mol Biol*, 239, p. 243

- Kristensen, B., Hegedus, L., Madsen, H. O., Smith, T. J. and Nielsen, C. H. (2014) Altered balance between self-reactive Th17 cells and Th10 cells and between full-length FOXP3 and FOXP3 splice variants in Hashimoto's thyroiditis. *Clin Exp Immunol*, doi: 10.1111/cei.12557
- Kruzel, M. L., Actor, J. K., Radak, Z., Bacsı, A., Saavedra-Molina, A. and Boldogh, I. (2010) Lactoferrin decreases LPS-induced mitochondrial dysfunction in cultured cells and in animal endotoxemia model. *Innate Immun*, 16(2), p. 67, doi: 10.1177/1753425909105317
- Kruzel, M. L., Bacsı, A., Choudhury, B., Sur, S. and Boldogh, I. (2006) Lactoferrin decreases pollen antigen-induced allergic airway inflammation in a murine model of asthma. *Immunology*, 119(2), p. 159, doi: 10.1111/j.1365-2567.2006.02417.x
- Kumar, M. V., Nagineni, C. N., Chin, M. S., Hooks, J. J. and Detrick, B. (2004) Innate immunity in the retina: Toll-like receptor (TLR) signaling in human retinal pigment epithelial cells. *J Neuroimmunol*, 153(1-2), p. 7, doi: 10.1016/j.jneuroim.2004.04.018
- Kuo, P. L., Chiang, H. S., Wang, Y. Y., Kuo, Y. C., Chen, M. F., Yu, I. S., Teng, Y. N., Lin, S. W. and Lin, Y. H. (2013) SEPT12-microtubule complexes are required for sperm head and tail formation. *Int J Mol Sci*, 14(11), p. 22102, doi: 10.3390/ijms141122102
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), p. 680
- Langner-Wegscheider, B. J. and de Smet, M. D. (2014) Surgical management of severe complications arising from uveitis in juvenile idiopathic arthritis. *Ophthalmologica*, 232(3), p. 179, doi: 10.1159/000365230
- Lee, N. Y., Rieckmann, P. and Kang, Y. S. (2012) The Changes of P-glycoprotein Activity by Interferon-gamma and Tumor Necrosis Factor-alpha in Primary and Immortalized Human Brain Microvascular Endothelial Cells. *Biomol Ther (Seoul)*, 20(3), p. 293, doi: 10.4062/biomolther.2012.20.3.293
- LeHoang, P., Sterkers, M., Thillaye, B., de Kozak, Y., Coscas, G. and Faure, J. P. (2008) Primate model of uveoretinitis and vasculitis/experimental autoimmune uveoretinitis induced in cynomolgus monkeys by retinal s antigen. *Ophthalmic Res*, 40(3-4), p. 181, doi: 10.1159/000119873
- Leipe, D. D., Wolf, Y. I., Koonin, E. V. and Aravind, L. (2002) Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. *J Mol Biol*, 317(1), p. 41, doi: 10.1006/jmbi.2001.5378
- Leyton, L. and Hagood, J. S. (2014) Thy-1 modulates neurological cell-cell and cell-matrix interactions through multiple molecular interactions. *Adv Neurobiol*, 8, p. 3
- Li, P., Gao, Y., Cao, J., Wang, W., Chen, Y., Zhang, G., Robson, S. C., Wu, Y. and Yang, J. (2015) CD39 regulatory T cells attenuate allergic airway inflammation. *Clin Exp Allergy*, doi: 10.1111/cea.12521

- Li, Q. F., Spinelli, A. M. and Tang, D. D. (2009) Cdc42GAP, reactive oxygen species, and the vimentin network. *Am J Physiol Cell Physiol*, 297(2), p. C299, doi: 10.1152/ajpcell.00037.2009
- Li, X., Gu, X., Boyce, T. M., Zheng, M., Reagan, A. M., Qi, H., Mandal, N., Cohen, A. W., Callegan, M. C., Carr, D. J. and Elliott, M. H. (2014) Caveolin-1 increases proinflammatory chemoattractants and blood-retinal barrier breakdown but decreases leukocyte recruitment in inflammation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 55(10), p. 6224, doi: 10.1167/iovs.14-14613
- Lood, C., Stenstrom, M., Tyden, H., Gullstrand, B., Kallberg, E., Leanderson, T., Truedsson, L., Sturfelt, G., Ivars, F. and Bengtsson, A. A. (2011) Protein synthesis of the pro-inflammatory S100A8/A9 complex in plasmacytoid dendritic cells and cell surface S100A8/A9 on leukocyte subpopulations in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*, 13(2), p. 60, doi: 10.1186/ar3314
- Lozano, E., Joller, N., Cao, Y., Kuchroo, V. K. and Hafler, D. A. (2013) The CD226/CD155 interaction regulates the proinflammatory (Th1/Th17)/anti-inflammatory (Th2) balance in humans. *J Immunol*, 191(7), p. 3673, doi: 10.4049/jimmunol.1300945
- Luger, D. and Caspi, R. R. (2008) New perspectives on effector mechanisms in uveitis. *Semin Immunopathol*, 30(2), p. 135, doi: 10.1007/s00281-008-0108-5
- Luger, D., Silver, P. B., Tang, J., Cua, D., Chen, Z., Iwakura, Y., Bowman, E. P., Sgambellone, N. M., Chan, C. C. and Caspi, R. R. (2008) Either a Th17 or a Th1 effector response can drive autoimmunity: conditions of disease induction affect dominant effector category. *J Exp Med*, 205(4), p. 799, doi: 10.1084/jem.20071258
- Ma, C. S., Nichols, K. E. and Tangye, S. G. (2007) Regulation of cellular and humoral immune responses by the SLAM and SAP families of molecules. *Annu Rev Immunol*, 25, p. 337, doi: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141651
- Maggi, L., Santarlasci, V., Capone, M., Rossi, M. C., Querci, V., Mazzoni, A., Cimaz, R., De Palma, R., Liotta, F., Maggi, E., Romagnani, S., Cosmi, L. and Annunziato, F. (2012) Distinctive features of classic and nonclassic (Th17 derived) human Th1 cells. *Eur J Immunol*, 42(12), p. 3180, doi: 10.1002/eji.201242648
- Makhoul, M., Bruyns, C., Edimo, W. E., Relvas, L. J., Bazewicz, M., Koch, P., Caspers, L. and Willermain, F. (2012) TNFalpha suppresses IFNgamma-induced MHC class II expression on retinal pigmented epithelial cells cultures. *Acta Ophthalmol*, 90(1), p. e 38, doi: 10.1111/j.1755-3768.2011.02241.x
- Mann, M. and Kelleher, N. L. (2008) Precision proteomics: the case for high resolution and high mass accuracy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(47), p. 18132, doi: 10.1073/pnas.0800788105
- Martin, C. M., Santos Lacombe, M., Serrano Molina, C. I., Ramirez Chamond, R. and Collantes Estevez, E. (2002) ICAM-1 expression on the surface of T lymphocytes in patients with uveitis: a comparative study between the eye and peripheral blood. *Ophthalmologica*, 216(3), p. 203, doi: 59632

- Masters, S. L., Lobito, A. A., Chae, J. and Kastner, D. L. (2006) Recent advances in the molecular pathogenesis of hereditary recurrent fevers. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 6(6), p. 428, doi: 10.1097/ACI.0b013e3280109b57
- Mazzoni, F., Safa, H. and Finnemann, S. C. (2014) Understanding photoreceptor outer segment phagocytosis: use and utility of RPE cells in culture. *Exp Eye Res*, 126, p. 51, doi: 10.1016/j.exer.2014.01.010
- Medawar, P. B. (1948) Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. *Br J Exp Pathol*, 29(1), p. 58
- Mesquida, M., Leszczynska, A., Llorenc, V. and Adan, A. (2014) Interleukin-6 blockade in ocular inflammatory diseases. *Clin Exp Immunol*, 176(3), p. 301, doi: 10.1111/cei.12295
- Mesri, M., Liversidge, J. and Forrester, J. V. (1994) ICAM-1/LFA-1 interactions in T-lymphocyte activation and adhesion to cells of the blood-retina barrier in the rat. *Immunology*, 83(1), p. 52
- Moran-Auth, Y., Penna-Martinez, M. and Badenhoop, K. (2015) VDR FokI polymorphism is associated with a reduced T-helper cell population under vitamin D stimulation in type 1 diabetes patients. *J Steroid Biochem Mol Biol*, doi: 10.1016/j.jsbmb.2015.01.003
- Moretti, S., Bozza, S., Oikonomou, V., Renga, G., Casagrande, A., Iannitti, R. G., Puccetti, M., Garlanda, C., Kim, S., Li, S., van de Veerdonk, F. L., Dinarello, C. A. and Romani, L. (2014) IL-37 inhibits inflammasome activation and disease severity in murine aspergillosis. *PLoS Pathog*, 10(11), p. 1004462, doi: 10.1371/journal.ppat.1004462
- Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A. and Coffman, R. L. (1986) Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*, 136(7), p. 2348
- Mullins, R. D., Heuser, J. A. and Pollard, T. D. (1998) The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(11), p. 6181
- Nair, P., Melarkode, R., Rajkumar, D. and Montero, E. (2010) CD6 synergistic co-stimulation promoting proinflammatory response is modulated without interfering with the activated leucocyte cell adhesion molecule interaction. *Clin Exp Immunol*, 162(1), p. 116, doi: 10.1111/j.1365-2249.2010.04235.x
- Narimatsu, T., Ozawa, Y., Miyake, S., Kubota, S., Hirasawa, M., Nagai, N., Shimmura, S. and Tsubota, K. (2013) Disruption of cell-cell junctions and induction of pathological cytokines in the retinal pigment epithelium of light-exposed mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 54(7), p. 4555, doi: 10.1167/iovs.12-11572
- Nath, P. R., Dong, G., Braiman, A. and Isakov, N. (2014) Immunophilins control T lymphocyte adhesion and migration by regulating CrkII binding to C3G. *J Immunol*, 193(8), p. 3966, doi: 10.4049/jimmunol.1303485

- Nian, H., Liang, D., Zuo, A., Wei, R., Shao, H., Born, W. K., Kaplan, H. J. and Sun, D. (2012) Characterization of autoreactive and bystander IL-17+ T cells induced in immunized C57BL/6 mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 53(2), p. 897, doi: 10.1167/iovs.11-8297
- Nishida, E., Chen, C., Morita, A. and Shimizu, J. (2011) Inhibition of T cell activation through down-regulation of TCR-CD3 expression mediated by an anti-CD90 Ab. *Immunol Lett*, 136(2), p. 163, doi: 10.1016/j.imlet.2011.01.006
- Nishikimi, A., Ishihara, S., Ozawa, M., Etoh, K., Fukuda, M., Kinashi, T. and Katagiri, K. (2014) Rab13 acts downstream of the kinase Mst1 to deliver the integrin LFA-1 to the cell surface for lymphocyte trafficking. *Sci Signal*, 7(336), p. 72, doi: 10.1126/scisignal.2005199
- Nowak, E. C., Weaver, C. T., Turner, H., Begum-Haque, S., Becher, B., Schreiner, B., Coyle, A. J., Kasper, L. H. and Noelle, R. J. (2009) IL-9 as a mediator of Th17-driven inflammatory disease. *J Exp Med*, 206(8), p. 1653, doi: 10.1084/jem.20090246
- Okunuki, Y., Usui, Y., Kezuka, T., Hattori, T., Masuko, K., Nakamura, H., Yudoh, K., Goto, H., Usui, M., Nishioka, K., Kato, T. and Takeuchi, M. (2008) Proteomic surveillance of retinal autoantigens in endogenous uveitis: implication of esterase D and brain-type creatine kinase as novel autoantigens. *Mol Vis*, 14, p. 1094
- Omri, S., Behar-Cohen, F., de Kozak, Y., Sennlaub, F., Verissimo, L. M., Jonet, L., Savoldelli, M., Omri, B. and Crisanti, P. (2011) Microglia/macrophages migrate through retinal epithelium barrier by a transcellular route in diabetic retinopathy: role of PKCzeta in the Goto Kakizaki rat model. *Am J Pathol*, 179(2), p. 942, doi: 10.1016/j.ajpath.2011.04.018
- Pan, W. and Kastin, A. J. (2002) TNFalpha transport across the blood-brain barrier is abolished in receptor knockout mice. *Exp Neurol*, 174(2), p. 193, doi: 10.1006/exnr.2002.7871
- Pao, L. I., Badour, K., Siminovitch, K. A. and Neel, B. G. (2007) Nonreceptor protein-tyrosine phosphatases in immune cell signaling. *Annu Rev Immunol*, 25, p. 473, doi: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115647
- Perdiguerro, E. G., Klapproth, K., Schulz, C., Busch, K., Azzoni, E., Crozet, L., Garner, H., Trouillet, C., de Bruijn, M. F., Geissmann, F. and Rodewald, H. R. (2014) Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature*, doi: 10.1038/nature13989
- Phillipson, M., Heit, B., Colarusso, P., Liu, L., Ballantyne, C. M. and Kubes, P. (2006) Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *J Exp Med*, 203(12), p. 2569, doi: 10.1084/jem.20060925
- Pieracci, F. M. and Barie, P. S. (2005) Iron and the risk of infection. *Surg Infect (Larchmt)*, 6 Suppl 1, p. 41, doi: 10.1089/sur.2005.6.s1-41

- Poirier, N., Azimzadeh, A. M., Zhang, T., Dilek, N., Mary, C., Nguyen, B., Tillou, X., Wu, G., Reneaudin, K., Hervouet, J., Martinet, B., Coulon, F., Allain-Launay, E., Karam, G., Soullillou, J. P., Pierson, R. N., 3rd, Blancho, G. and Vanhove, B. (2010) Inducing CTLA-4-dependent immune regulation by selective CD28 blockade promotes regulatory T cells in organ transplantation. *Sci Transl Med*, 2(17), doi: 10.1126/scitranslmed.3000116
- Pulli, B. and Chen, J. W. (2014) Imaging Neuroinflammation - from Bench to Bedside. *J Clin Cell Immunol*, 5, p. 226, doi: 10.4172/2155-9899.1000226
- Qiao, G., Yang, L., Li, Z., Williams, J. W. and Zhang, J. (2015) A77 1726, the Active Metabolite of Leflunomide, Attenuates Lupus Nephritis by Promoting the Development of Regulatory T Cells and Inhibiting IL-17-Producing Double Negative T Cells. *Clin Immunol*, doi: 10.1016/j.clim.2015.01.006
- Ransohoff, R. M. and Engelhardt, B. (2012) The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. *Nat Rev Immunol*, 12(9), p. 623, doi: 10.1038/nri3265
- Raphael, I., Nalawade, S., Eagar, T. N. and Forsthuber, T. G. (2014) T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine*, doi: 10.1016/j.cyto.2014.09.011
- Rathinam, V. A., Vanaja, S. K. and Fitzgerald, K. A. (2012) Regulation of inflammasome signaling. *Nat Immunol*, 13(4), p. 333, doi: 10.1038/ni.2237
- Rebhun, W. C. (1979) Diagnosis and treatment of equine uveitis. *J Am Vet Med Assoc*, 175(8), p. 803
- Regan, D. P., Aarnio, M. C., Davis, W. S., Carmichael, K. P., Vandenplas, M. L., Lauderdale, J. D. and Moore, P. A. (2012) Characterization of cytokines associated with Th17 cells in the eyes of horses with recurrent uveitis. *Vet Ophthalmol*, 15(3), p. 145, doi: 10.1111/j.1463-5224.2011.00951.x
- Ren, D., Kim, H., Tu, H. C., Westergard, T. D., Fisher, J. K., Rubens, J. A., Korsmeyer, S. J., Hsieh, J. J. and Cheng, E. H. (2009) The VDAC2-BAK rheostat controls thymocyte survival. *Sci Signal*, 2(85), p. 48, doi: 10.1126/scisignal.2000274
- Ricard, I., Payet, M. D. and Dupuis, G. (1997) Clustering the adhesion molecules VLA-4 (CD49d/CD29) in Jurkat T cells or VCAM-1 (CD106) in endothelial (ECV 304) cells activates the phosphoinositide pathway and triggers Ca<sup>2+</sup> mobilization. *Eur J Immunol*, 27(6), p. 1530, doi: 10.1002/eji.1830270632
- Rocha-Perugini, V., Gonzalez-Granado, J. M., Tejera, E., Lopez-Martin, S., Yanez-Mo, M. and Sanchez-Madrid, F. (2014) Tetraspanins CD9 and CD151 at the immune synapse support T-cell integrin signaling. *Eur J Immunol*, 44(7), p. 1967, doi: 10.1002/eji.201344235
- Rom, S., Zuluaga-Ramirez, V., Dykstra, H., Reichenbach, N. L., Ramirez, S. H. and Persidsky, Y. (2015) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibition in brain endothelium



- protects the blood-brain barrier under physiologic and neuroinflammatory conditions. *J Cereb Blood Flow Metab*, 35(1), p. 28, doi: 10.1038/jcbfm.2014.167
- Romeike, A., Brugmann, M. and Drommer, W. (1998) Immunohistochemical studies in equine recurrent uveitis (ERU). *Vet Pathol*, 35(6), p. 515
- Rosales, M. A., Silva, K. C., Duarte, D. A., Rossato, F. A., Lopes de Faria, J. B. and Lopes de Faria, J. M. (2014) Endocytosis of tight junctions caveolin nitrosylation dependent is improved by cocoa via opioid receptor on RPE cells in diabetic conditions. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 55(9), p. 6090, doi: 10.1167/iovs.14-14234
- Rosenbaum, D. M., Rasmussen, S. G. and Kobilka, B. K. (2009) The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature*, 459(7245), p. 356, doi: 10.1038/nature08144
- Roth, J., Burwinkel, F., van den Bos, C., Goebeler, M., Vollmer, E. and Sorg, C. (1993) MRP8 and MRP14, S-100-like proteins associated with myeloid differentiation, are translocated to plasma membrane and intermediate filaments in a calcium-dependent manner. *Blood*, 82(6), p. 1875
- Saalbach, A., Haustein, U. F. and Anderegg, U. (2000) A ligand of human thy-1 is localized on polymorphonuclear leukocytes and monocytes and mediates the binding to activated thy-1-positive microvascular endothelial cells and fibroblasts. *J Invest Dermatol*, 115(5), p. 882, doi: 10.1046/j.1523-1747.2000.00104.x
- Sakaguchi, M., Murata, H., Aoyama, Y., Hibino, T., Putranto, E. W., Ruma, I. M., Inoue, Y., Sakaguchi, Y., Yamamoto, K., Kinoshita, R., Futami, J., Kataoka, K., Iwatsuki, K. and Huh, N. H. (2014) DNAX-activating protein 10 (DAP10) membrane adaptor associates with receptor for advanced glycation end products (RAGE) and modulates the RAGE-triggered signaling pathway in human keratinocytes. *J Biol Chem*, 289(34), p. 23389, doi: 10.1074/jbc.M114.573071
- Salinovich, O. and Montelaro, R. C. (1986) Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem*, 156(2), p. 341
- Santa Cruz Biotechnology, I. Septin 7 (H-120):sc-20620. in, <http://datasheets.scbt.com/sc-20620.pdf>
- Santoni, V., Molloy, M. and Rabilloud, T. (2000) Membrane proteins and proteomics: un amour impossible? *Electrophoresis*, 21(6), p. 1054, doi: 10.1002/(SICI)1522-2683(20000401)21:6<1054::AID-ELPS1054>3.0.CO;2-8
- Schaerli, P., Willmann, K., Lang, A. B., Lipp, M., Loetscher, P. and Moser, B. (2000) CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. *J Exp Med*, 192(11), p. 1553
- Schaftenaar, E., van Gorp, E. C., Meenken, C., Osterhaus, A. D., Remeijer, L., Struthers, H. E., McIntyre, J. A., Baarsma, G. S., Verjans, G. M. and Peters, R. P. (2014) Ocular infections in sub-Saharan Africa in the context of high HIV prevalence. *Trop Med Int Health*, 19(9), p. 1003, doi: 10.1111/tmi.12350

- Schiopu, A. and Cotoi, O. S. (2013) S100A8 and S100A9: DAMPs at the crossroads between innate immunity, traditional risk factors, and cardiovascular disease. *Mediators Inflamm*, 2013, p. 828354, doi: 10.1155/2013/828354
- Schroedl, F., Kaser-Eichberger, A., Schlereth, S. L., Bock, F., Regenfuss, B., Reitsamer, H. A., Luty, G. A., Maruyama, K., Chen, L., Lutjen-Drecoll, E., Dana, R., Kerjaschki, D., Alitalo, K., De Stefano, M. E., Junghans, B. M., Heindl, L. M. and Cursiefen, C. (2014) Consensus statement on the immunohistochemical detection of ocular lymphatic vessels. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 55(10), p. 6440, doi: 10.1167/iovs.14-15638
- Schubert, K., Polte, T., Bonisch, U., Schader, S., Holtappels, R., Hildebrandt, G., Lehmann, J., Simon, J. C., Anderegg, U. and Saalbach, A. (2011) Thy-1 (CD90) regulates the extravasation of leukocytes during inflammation. *Eur J Immunol*, 41(3), p. 645, doi: 10.1002/eji.201041117
- Schulz, M., Dotzlaw, H., Mikkat, S., Eggert, M. and Neeck, G. (2007) Proteomic analysis of peripheral blood mononuclear cells: selective protein processing observed in patients with rheumatoid arthritis. *J Proteome Res*, 6(9), p. 3752, doi: 10.1021/pr070285f
- Schwink, K. L. (1992) Equine uveitis. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 8(3), p. 557
- Shai, R., Quismorio, F. P., Jr., Li, L., Kwon, O. J., Morrison, J., Wallace, D. J., Neuwelt, C. M., Brautbar, C., Gauderman, W. J. and Jacob, C. O. (1999) Genome-wide screen for systemic lupus erythematosus susceptibility genes in multiplex families. *Hum Mol Genet*, 8(4), p. 639
- Shao, H., Sun, S. L., Kaplan, H. J. and Sun, D. (2004) Characterization of rat CD8+ uveitogenic T cells specific for interphotoreceptor retinal-binding protein 1177-1191. *J Immunol*, 173(4), p. 2849
- Shattil, S. J., Kim, C. and Ginsberg, M. H. (2010) The final steps of integrin activation: the end game. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(4), p. 288, doi: 10.1038/nrm2871
- Sheffield, P. J., Oliver, C. J., Kremer, B. E., Sheng, S., Shao, Z. and Macara, I. G. (2003) Borg/septin interactions and the assembly of mammalian septin heterodimers, trimers, and filaments. *J Biol Chem*, 278(5), p. 3483, doi: 10.1074/jbc.M209701200
- Solt, L. A., Banerjee, S., Campbell, S., Kamenecka, T. M. and Burris, T. P. (2015) ROR Inverse Agonist Suppresses Insulinitis and Prevents Hyperglycemia in a Mouse Model of Type 1 Diabetes. *Endocrinology*, 156(3), p. 869, doi: 10.1210/en.2014-1677
- Stadtman, A., Brinkhaus, L., Mueller, H., Rossaint, J., Bolomini-Vittori, M., Bergmeier, W., Van Aken, H., Wagner, D. D., Laudanna, C., Ley, K. and Zarbock, A. (2011) Rap1a activation by CalDAG-GEFI and p38 MAPK is involved in E-selectin-dependent slow leukocyte rolling. *Eur J Immunol*, 41(7), p. 2074, doi: 10.1002/eji.201041196
- Sun, D., Enzmann, V., Lei, S., Sun, S. L., Kaplan, H. J. and Shao, H. (2003) Retinal pigment epithelial cells activate uveitogenic T cells when they express high levels of MHC class II molecules, but inhibit T cell activation when they express restricted levels. *J Neuroimmunol*, 144(1-2), p. 1

- Swadzba, M. E., Hauck, S. M., Naim, H. Y., Amann, B. and Deeg, C. A. (2012a) Retinal glycoprotein enrichment by concanavalin a enabled identification of novel membrane autoantigen synaptotagmin-1 in equine recurrent uveitis. *PLoS One*, 7(12), p. 50929, doi: 10.1371/journal.pone.0050929
- Swadzba, M. E., Hirmer, S., Amann, B., Hauck, S. M. and Deeg, C. A. (2012b) Vitreal IgM autoantibodies target neurofilament medium in a spontaneous model of autoimmune uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 53(1), p. 294, doi: 10.1167/iovs.11-8734
- Szober, C. M., Hauck, S. M., Euler, K. N., Frohlich, K. J., Alge-Priglinger, C., Ueffing, M. and Deeg, C. A. (2012) Profound re-organization of cell surface proteome in equine retinal pigment epithelial cells in response to in vitro culturing. *Int J Mol Sci*, 13(11), p. 14053, doi: 10.3390/ijms131114053
- Tagami, M., Kusahara, S., Honda, S., Tsukahara, Y. and Negi, A. (2009) Expression of ATP-binding cassette transporters at the inner blood-retinal barrier in a neonatal mouse model of oxygen-induced retinopathy. *Brain Res*, 1283, p. 186, doi: 10.1016/j.brainres.2009.05.095
- Tan, L. T., Isa, H., Lightman, S. and Taylor, S. R. (2012) Prevalence and causes of phthisis bulbi in a uveitis clinic. *Acta Ophthalmol*, 90(5), p. 417, doi: 10.1111/j.1755-3768.2011.02319.x
- Tan, X., Takahashi, H., Nishida, J., Aoki, A., Inoue, T. and Yanagi, Y. (2015) Excessive retinol intake exacerbates choroidal neovascularization through upregulated vascular endothelial growth factor in retinal pigment epithelium in mice. *Exp Eye Res*, 131, p. 77, doi: 10.1016/j.exer.2015.01.005
- Tanaka, T., Morita, H., Yoo, Y. C., Kim, W. S., Kumura, H. and Shimazaki, K. (2004) Detection of bovine lactoferrin binding protein on Jurkat human lymphoblastic T cell line. *J Vet Med Sci*, 66(7), p. 865
- Tang, D. D. and Gunst, S. J. (2004) The small GTPase Cdc42 regulates actin polymerization and tension development during contractile stimulation of smooth muscle. *J Biol Chem*, 279(50), p. 51722, doi: 10.1074/jbc.M408351200
- Tang, J., Zhu, W., Silver, P. B., Su, S. B., Chan, C. C. and Caspi, R. R. (2007) Autoimmune uveitis elicited with antigen-pulsed dendritic cells has a distinct clinical signature and is driven by unique effector mechanisms: initial encounter with autoantigen defines disease phenotype. *J Immunol*, 178(9), p. 5578
- Terabe, M., Matsui, S., Park, J. M., Mamura, M., Noben-Trauth, N., Donaldson, D. D., Chen, W., Wahl, S. M., Ledbetter, S., Pratt, B., Letterio, J. J., Paul, W. E. and Berzofsky, J. A. (2003) Transforming growth factor-beta production and myeloid cells are an effector mechanism through which CD1d-restricted T cells block cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor immunosurveillance: abrogation prevents tumor recurrence. *J Exp Med*, 198(11), p. 1741, doi: 10.1084/jem.20022227

- Tesija-Kuna, A., Grazio, S., Miler, M., Vukasovic, I., Peric, P. and Vrkic, N. (2010) Antibodies targeting mutated citrullinated vimentin in patients with psoriatic arthritis. *Clin Rheumatol*, 29(5), p. 487, doi: 10.1007/s10067-009-1345-2
- Tojkander, S., Gateva, G. and Lappalainen, P. (2012) Actin stress fibers--assembly, dynamics and biological roles. *J Cell Sci*, 125(Pt 8), p. 1855, doi: 10.1242/jcs.098087
- Tokhtaeva, E., Capri, J., Marcus, E. A., Whitelegge, J. P., Khuzakhmetova, V., Bukharaeva, E., Deiss-Yehiely, N., Dada, L. A., Sachs, G., Fernandez-Salas, E. and Vagin, O. (2015) Septin dynamics are essential for exocytosis. *J Biol Chem*, doi: 10.1074/jbc.M114.616201
- Tooley, A. J., Gilden, J., Jacobelli, J., Beemiller, P., Trimble, W. S., Kinoshita, M. and Krummel, M. F. (2009) Amoeboid T lymphocytes require the septin cytoskeleton for cortical integrity and persistent motility. *Nat Cell Biol*, 11(1), p. 17, doi: 10.1038/ncb1808
- Ubel, C., Graser, A., Koch, S., Rieker, R. J., Lehr, H. A., Muller, M. and Finotto, S. (2014) Role of Tyk-2 in Th9 and Th17 cells in allergic asthma. *Sci Rep*, 4, p. 5865, doi: 10.1038/srep05865
- Uhl, P. B., Szober, C. M., Amann, B., Alge-Priglinger, C., Ueffing, M., Hauck, S. M. and Deeg, C. A. (2014) In situ cell surface proteomics reveals differentially expressed membrane proteins in retinal pigment epithelial cells during autoimmune uveitis. *J Proteomics*, 109, p. 50, doi: 10.1016/j.jprot.2014.06.020
- Uotila, L. M., Jahan, F., Soto Hinojosa, L., Melandri, E., Gronholm, M. and Gahmberg, C. G. (2014) Specific phosphorylations transmit signals from leukocyte beta2 to beta1 integrins and regulate adhesion. *J Biol Chem*, 289(46), p. 32230, doi: 10.1074/jbc.M114.588111
- Valitutti, S., Muller, S., Cella, M., Padovan, E. and Lanzavecchia, A. (1995) Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes. *Nature*, 375(6527), p. 148, doi: 10.1038/375148a0
- Vallenius, T. (2013) Actin stress fibre subtypes in mesenchymal-migrating cells. *Open Biol*, 3(6), p. 130001, doi: 10.1098/rsob.130001
- van Driel, B., Liao, G., Romero, X., O'Keeffe, M. S., Wang, G., Faubion, W. A., Berger, S. B., Magelky, E. M., Manocha, M., Azcutia, V., Grisham, M., Luscinskas, F. W., Mizoguchi, E., de Waal Malefyt, R., Reinecker, H. C., Bhan, A. K., Wang, N. and Terhorst, C. (2012) Signaling lymphocyte activation molecule regulates development of colitis in mice. *Gastroenterology*, 143(6), p. 1544, doi: 10.1053/j.gastro.2012.08.042
- Veillette, A., Dong, Z. and Latour, S. (2007) Consequence of the SLAM-SAP signaling pathway in innate-like and conventional lymphocytes. *Immunity*, 27(5), p. 698, doi: 10.1016/j.immuni.2007.11.005
- Verma, N. D., Hall, B. M., Plain, K. M., Robinson, C. M., Boyd, R., Tran, G. T., Wang, C., Bishop, G. A. and Hodgkinson, S. J. (2014) Interleukin-12 (IL-12p70) Promotes

- Induction of Highly Potent Th1-Like CD4(+)CD25(+) T Regulatory Cells That Inhibit Allograft Rejection in Unmodified Recipients. *Front Immunol*, 5, p. 190, doi: 10.3389/fimmu.2014.00190
- Vilar, M. L., Frutuoso, M. S., Arruda, S. M., Lima, D. M., Bezerra, C. S. and Pompeu, M. M. (2011) The role of the SLAM-SAP signaling pathway in the modulation of CD4+ T cell responses. *Braz J Med Biol Res*, 44(4), p. 276
- Volceanov, L., Herbst, K., Biniossek, M., Schilling, O., Haller, D., Nolke, T., Subbarayal, P., Rudel, T., Zieger, B. and Hacker, G. (2014) Septins arrange F-actin-containing fibers on the Chlamydia trachomatis inclusion and are required for normal release of the inclusion by extrusion. *MBio*, 5(5), p. 1802, doi: 10.1128/mBio.01802-14
- von Wedel-Parlow, M., Schrot, S., Lemmen, J., Treeratanapiboon, L., Wegener, J. and Galla, H. J. (2011) Neutrophils cross the BBB primarily on transcellular pathways: an in vitro study. *Brain Res*, 1367, p. 62, doi: 10.1016/j.brainres.2010.09.076
- Wallace, C. A., Moir, G., Malone, D. F., Duncan, L., Devarajan, G. and Crane, I. J. (2013) Regulation of T-lymphocyte CCL3 and CCL4 production by retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 54(1), p. 722, doi: 10.1167/iovs.12-10602
- Wang, H. W., Babic, A. M., Mitchell, H. A., Liu, K. and Wagner, D. D. (2005) Elevated soluble ICAM-1 levels induce immune deficiency and increase adiposity in mice. *FASEB J*, 19(8), p. 1018, doi: 10.1096/fj.04-3094fje
- Wang, L., Luo, H., Chen, X., Jiang, Y. and Huang, Q. (2014) Functional characterization of S100A8 and S100A9 in altering monolayer permeability of human umbilical endothelial cells. *PLoS One*, 9(3), p. 90472, doi: 10.1371/journal.pone.0090472
- Wei, R., Dong, L., Xiao, Q., Sun, D., Li, X. and Nian, H. (2014) Engagement of Toll-like receptor 2 enhances interleukin (IL)-17(+) autoreactive T cell responses via p38 mitogen-activated protein kinase signalling in dendritic cells. *Clin Exp Immunol*, 178(2), p. 353, doi: 10.1111/cei.12405
- Weirich, C. S., Erzberger, J. P. and Barral, Y. (2008) The septin family of GTPases: architecture and dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(6), p. 478, doi: 10.1038/nrm2407
- Werry, H. and Gerhards, H. (1992) [The surgical therapy of equine recurrent uveitis]. *Tierarztl Prax*, 20(2), p. 178
- Whitcup, S. M., DeBarge, L. R., Caspi, R. R., Harning, R., Nussenblatt, R. B. and Chan, C. C. (1993) Monoclonal antibodies against ICAM-1 (CD54) and LFA-1 (CD11a/CD18) inhibit experimental autoimmune uveitis. *Clin Immunol Immunopathol*, 67(2), p. 143
- Wildner, G. and Diedrichs-Moehring, M. (2005) Multiple autoantigen mimotopes of infectious agents induce autoimmune arthritis and uveitis in lewis rats. *Clin Diagn Lab Immunol*, 12(5), p. 677, doi: 10.1128/CDLI.12.5.677-679.2005
- Williams, P. and Griffiths, E. (1992) Bacterial transferrin receptors--structure, function and contribution to virulence. *Med Microbiol Immunol*, 181(6), p. 301

- Winkler, E. A., Bell, R. D. and Zlokovic, B. V. (2011) Central nervous system pericytes in health and disease. *Nat Neurosci*, 14(11), p. 1398, doi: 10.1038/nn.2946
- Xie, Q., Klesney-Tait, J., Keck, K., Parlet, C., Borcherdig, N., Kolb, R., Li, W., Tygrett, L., Waldschmidt, T., Olivier, A., Chen, S., Liu, G. H., Li, X. and Zhang, W. (2014) Characterization of a novel mouse model with genetic deletion of CD177. *Protein Cell*, doi: 10.1007/s13238-014-0109-1
- Xu, S., Jia, Z. F., Kang, C., Huang, Q., Wang, G., Liu, X., Zhou, X., Xu, P. and Pu, P. (2010) Upregulation of SEPT7 gene inhibits invasion of human glioma cells. *Cancer Invest*, 28(3), p. 248, doi: 10.3109/07357900903179609
- Yang, J., Chow, I. T., Sosinowski, T., Torres-Chinn, N., Greenbaum, C. J., James, E. A., Kappler, J. W., Davidson, H. W. and Kwok, W. W. (2014) Autoreactive T cells specific for insulin B:11-23 recognize a low-affinity peptide register in human subjects with autoimmune diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(41), p. 14840, doi: 10.1073/pnas.1416864111
- Zarbock, A., Deem, T. L., Burcin, T. L. and Ley, K. (2007) Gα<sub>12</sub> is required for chemokine-induced neutrophil arrest. *Blood*, 110(10), p. 3773, doi: 10.1182/blood-2007-06-094565
- Zhang, Y., Yuan, F., Cao, X., Zhai, Z., GangHuang, Du, X., Wang, Y., Zhang, J., Huang, Y., Zhao, J. and Hou, W. (2014) P2X7 receptor blockade protects against cisplatin-induced nephrotoxicity in mice by decreasing the activities of inflammasome components, oxidative stress and caspase-3. *Toxicol Appl Pharmacol*, 281(1), p. 1, doi: 10.1016/j.taap.2014.09.016
- Zhao, J., Chen, M. and Xu, H. (2014) Experimental autoimmune uveoretinitis (EAU)-related tissue damage and angiogenesis is reduced in CCL2(-)/(-)CX(3)CR1gfp/gfp mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 55(11), p. 7572, doi: 10.1167/iovs.14-15495
- Zhou, J., Lu, S., Yang, S., Chen, H., Shi, H., Miao, M. and Jiao, B. (2014) MicroRNA-127 post-transcriptionally downregulates Sept7 and suppresses cell growth in hepatocellular carcinoma cells. *Cell Physiol Biochem*, 33(5), p. 1537, doi: 10.1159/000358717
- Zhou, L., Ivanov, I., Spolski, R., Min, R., Shenderov, K., Egawa, T., Levy, D. E., Leonard, W. J. and Littman, D. R. (2007) IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol*, 8(9), p. 967, doi: 10.1038/ni1488
- Zimecki, M., Miedzybrodzki, R., Mazurier, J. and Spik, G. (1999) Regulatory effects of lactoferrin and lipopolysaccharide on LFA-1 expression on human peripheral blood mononuclear cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 47(4), p. 257
- Zimmerman, A. W., Joosten, B., Torensma, R., Parnes, J. R., van Leeuwen, F. N. and Figdor, C. G. (2006) Long-term engagement of CD6 and ALCAM is essential for T-cell proliferation induced by dendritic cells. *Blood*, 107(8), p. 3212, doi: 10.1182/blood-2005-09-3881

- Zipplies, J. K., Hauck, S. M., Schoeffmann, S., Amann, B., Stangassinger, M., Ueffing, M. and Deeg, C. A. (2009) Serum PEDF levels are decreased in a spontaneous animal model for human autoimmune uveitis. *J Proteome Res*, 8(2), p. 992, doi: 10.1021/pr800694y
- Zold, E., Szodoray, P., Nakken, B., Barath, S., Kappelmayer, J., Csathy, L., Hajas, A., Sipka, S., Gyimesi, E., Gaal, J., Barta, Z., Hallay, J., Szegedi, G. and Bodolay, E. (2011) Alfacalcidol treatment restores derailed immune-regulation in patients with undifferentiated connective tissue disease. *Autoimmun Rev*, 10(3), p. 155, doi: 10.1016/j.autrev.2010.09.018

## **DANKSAGUNG**

Den Herren Professoren Dr. Thomas Göbel und Dr. Manfred Stangassinger danke ich ganz herzlich für den Arbeitsplatz am Institut für Tierphysiologie der LMU München, der mir zur Verfügung gestellt wurde.

Meiner Doktormutter, Frau Prof. Dr. Cornelia Deeg, bin ich ebenfalls zu großem Dank verpflichtet. Durch ihre außerordentliche fachliche Kompetenz und enormen zeitlichen Aufwand ermöglichte sie mir die Anfertigung dieser Arbeit. Das interessante Thema, dass sie mir freundlicherweise überließ, steigerte meine Begeisterung für das wissenschaftliche Arbeiten ungemein.

Auch Frau Dr. Elisabeth Kremmer, unter deren kompetenter Leitung die Produktion der anti-Septin7-Antikörper stattfand, trug maßgeblich zu dieser Arbeit bei. Ihr gilt dafür mein besonderer Dank.

Den Mitarbeitern der Research Unit Protein Science und der Core Facility Proteomics des Helmholtz Zentrums München danke ich dafür, dass sie mich mit großer Herzlichkeit aufgenommen und meine zahllosen Fragen jederzeit geduldig und aufschlussreich beantwortet haben. Unter den vielen tollen Menschen, die ich im Helmholtz Zentrum kennengelernt habe, möchte ich vor allem Frau Dr. Stefanie Hauck meinen Dank aussprechen, ohne deren Expertise, unter anderem auf den Gebieten der Massenspektrometrie und der Immunpräzipitation, ich die in dieser Arbeit dargelegten Experimente nicht erfolgreich hätte durchführen können.

Herrn Prof. Dr. Marius Ueffing, der mir als Leiter der Research Unit Protein Science einen Arbeitsplatz im Helmholtz Zentrum München zur Verfügung stellte, danke ich herzlich für die Möglichkeit, Einblick in mir bis dahin unbekannte Forschungsmethoden zu erlangen und mein Interesse an der Proteomanalytik dadurch weiter zu steigern.

Mein Dank gilt auch den Herren Professoren Dr. Hartmut Gerhards und Dr. Lutz Göhring für die Überlassung von Blut- und Glaskörperspülproben der in dieser Arbeit untersuchten Tiere. Dem ganzen Team der Klinik für Pferde der LMU München danke ich außerdem für die allzeit gute Zusammenarbeit und freundliche Unterstützung bei der Blutprobenentnahme. Insbesondere bedanke ich mich bei allen



Tierpflegern und Tierärzten, die sich tagtäglich liebevoll um Wendelstein, Diamant, Resita und Norderney kümmern. Ohne die Sicherheit, die diese Menschen den vier Pferden geben, wären die häufigen Blutentnahmen vielleicht nicht so problemlos möglich gewesen.

Sieglinde Hirmer und Bärbl Amann danke ich für die Hilfe bei technischen Fragen und Problemen jeder Art. Ihre Erfahrung und Hilfsbereitschaft hat mich aus so einigen aussichtslosen Situationen geführt.

Meinen Kollegen Roxane Degroote, Margarete Swadzba, Kerstin Euler und Christoph Szober danke ich dafür, dass sie ihr beeindruckendes Wissen mit mir geteilt und nie die Geduld verloren haben. Ihr wart großartige Lehrer!

Karina Lutterberg, meiner inzwischen schon nicht mehr ganz so neuen Kollegin, danke ich für unglaublich coole Reaktionen auf schockierende Enthüllungen, für die Vertreibung der Einsamkeit aus „meinem“ kleinen Kabuff und für die vielen lustigen Stunden, die wir in uns hinein oder laut heraus kichernd nebeneinander gesessen haben während draußen Musik, Gesang, Sprichwörter und der tägliche Wahnsinn ihr Unwesen trieben. Macht nix, wir spinnen auch!

Besondere Erwähnung verdienen Kristina Kleinwort und Patrizia Uhl, die mich als Kolleginnen und Freundinnen während meiner gesamten Doktorandenzeit begleitet haben. Ihr wart meine Berater, Kritiker und Psychotherapeuten, habt mich aufgebaut und mir in den Hintern getreten – alles immer genau zur richtigen Zeit. Wir haben zusammen gelacht und geweint, manchmal sogar beides gleichzeitig, uns nach jedem Rückschlag gegenseitig wieder aufgerichtet und am Ende unsere Erfolge zusammen gefeiert. Ihr wart tolle Kolleginnen, werdet tolle Tierärztinnen und seid großartige Freundinnen. Ohne euch wär's einfach nicht gegangen.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner lieben Familie, die mich, seit dem wir miteinander über Bluts- oder andere Bande verbunden sind, in allem unterstützt hat, was mir wichtig erschien. Ihr habt immer an mich geglaubt und nie die Geduld verloren.

Meiner Mutter danke ich besonders für all ihre Unterstützung, für die Momente der Zerstreuung in stressigen Phasen und für jedes einzelne der lustigen und auch

ernsthaften Gespräche über Vergangenheit, Gegenwart und Zukunft. Auf dem Fundament ihres Vorbilds und ihrer Liebe steht ein großer Teil meiner Motivation.

Mein Vater hat mir, trotz der über viele Jahre großen Entfernung, immer den Rücken freigehalten und mich darin bestärkt, ich selbst zu bleiben und meinen Weg zu gehen. Nicht nur seine finanzielle Unterstützung hat es mir ermöglicht, mein Studium aufzunehmen und erfolgreich zu beenden; er hat auch in allen Fragen des Lebens stets zu mir gehalten und ist mir in jeder Hinsicht eine wichtige Stütze. Mit großem Stolz widme ich ihm diese Arbeit.